

LOZANO SANTOS, Carol Patricia - MEDICINA

T 39188

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Facultad de Medicina

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular



**ANÁLISIS DE ALTERACIONES MOLECULARES COMO
FACTORES PRONÓSTICOS Y ESTUDIO DEL EFECTO
CITOTÓXICO IN VITRO DE COMBINACIONES
DE FÁRMACOS EN PACIENTES CON
LEUCEMIA LINFOCÍTICA CRÓNICA**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR PRESENTADA POR

Carol Patricia Lozano Santos

BAJO LA DIRECCIÓN DEL DOCTOR

José Antonio García Marco

Madrid, 2016

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular III



TESIS DOCTORAL

**Análisis de alteraciones moleculares como factores
pronósticos y estudio del efecto citotóxico in vitro de
combinaciones de fármacos en pacientes con leucemia
linfocítica crónica**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Carol Patricia Lozano Santos

Director

José Antonio García Marco

Madrid, 2018



El Dr. José Antonio García Marco, responsable del laboratorio de Citogenética Molecular y del diagnóstico y tratamiento de la leucemia linfocítica crónica del Servicio de Hematología del Hospital Universitario Puerta de Hierro-Majadahonda (Madrid)

CERTIFICA

Que el trabajo titulado: **“Análisis de alteraciones moleculares como factores pronósticos y estudio del efecto citotóxico *in vitro* de combinaciones de fármacos en pacientes con Leucemia Linfocítica Crónica”**, que presenta Carol Patricia Lozano Santos para la obtención del grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid, ha sido realizado bajo su dirección en el Hospital Universitario Puerta de Hierro de Majadahonda, y reúne la calidad y contenido suficiente para ser defendido ante el tribunal correspondiente

Para que así conste a los efectos oportunos, se expide el presente certificado en Madrid el 7 de Octubre de 2016.

Fdo. José Antonio García Marco



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE



5333385939

150486469







9552280000

Índice

Indices

SUMMARY	1
RESUMEN	7
Introducción	7
1. INTRODUCCIÓN.....	13
1.1. Características principales de la leucemia linfocítica crónica (LLC)	13
1.2. Desarrollo del linfocito B tumoral en la LLC.....	14
1.2.1. Ontogenia del linfocito B.....	14
1.2.2. Origen del linfocito B en la LLC	16
1.3. Marcadores pronósticos en la LLC.....	19
1.3.1. Marcadores clínicos clásicos.....	19
1.3.1.1. Sistema de clasificación Rai / Binet.....	19
1.3.1.2. Patrón de infiltración de médula ósea	21
1.3.1.3. Recuento linfocitario y tiempo de duplicación	21
1.3.1.4. Marcadores séricos	21
1.3.2. Marcadores de expresión de proteína	22
1.3.2.1. Expresión de ZAP-70 y CD38	22
1.3.3. Marcadores genéticos en LLC	23
1.3.3.1. Estado mutacional de los genes IgVH	23
1.3.3.2. Alteraciones citogenéticas	24
1.3.3.2.1. Deleción 13q14	24
1.3.3.2.2. Trisomía 12.....	25
1.3.3.2.3. Deleción 11q y mutación del gen ATM	25
1.3.3.2.4. Deleción 17p13 y mutaciones del gen TP53	27
1.3.3.2.5. Complejidad genómica.....	28
1.3.3.3. Nuevas mutaciones genéticas.....	29
1.3.3.3.1. Gen BIRC3.....	29
1.3.3.3.4. Gen NOTCH1	31
1.4. Regulación de la apoptosis en la LLC	33
1.4.1. Apoptosis y vías de señalización	33
1.4.2. Proteínas de la familia Bcl-2	35
1.4.3. Expresión de la familia Bcl-2 en la resistencia a fármacos en LLC	38
1.5. Microambiente celular de la LLC	39
1.5.1. Microambientes especializados.....	40

1.5.1.1. Microambiente de la médula ósea	41
1.5.1.2. Microambiente de los órganos linfoides secundarios	41
1.5.2. Células del microambiente celular	41
1.5.2.1. Células estromales mesenquimales (MSCs).....	41
1.5.2.2. Células nodriza de linaje mieloide (NLCs)	42
1.5.2.3. Las células T.....	43
1.5.2.4. Células dendríticas foliculares (FDCs)	43
1.6. Angiogénesis en la LLC	43
1.6.1. Familia VEGF	44
1.6.2. Estructura y expresión del gen VEGFA	44
1.6.3. Receptores de VEGFA.....	45
1.6.4. Funciones de VEGFA en la LLC	45
1.6.4.1 Función pro-angiogénica.....	46
1.6.4.2. Función pro-supervivencia	46
1.6.4.3. Función en la regulación de la motilidad celular	47
1.6.4.4. Función en el microambiente celular.....	47
1.6.4.5. Función como factor pronóstico	47
1.7. Tratamiento en la LLC	48
1.7.1. Criterios para el inicio del tratamiento	48
1.7.2. Factores pronósticos que afectan la respuesta al tratamiento.....	49
1.7.3. Evolución de los tratamientos	49
1.7.4. Elección del tratamiento de primera línea	50
1.7.5. Tratamiento en pacientes refractarios.....	52
1.8. Tratamiento experimental de fármacos con actividad antitumoral <i>in vitro</i> en pacientes de LLC con pronóstico adverso	53
1.7.6.1. Forodesina.....	53
1.7.6.2. Trióxido arsénico (ATO).....	54
2. OBJETIVOS	56
3. PACIENTES Y METODOLOGÍA	58
3.1. Muestras biológicas	58
3.1.1. Pacientes	58
3.1.2. Muestras control	58
3.1.3. Líneas celulares	59

3.2. Obtención y purificación de las células mononucleadas: linfocitos B y granulocitos	59
3.3. Extracción de ADN	60
3.3.1. Extracción de ADN mediante DNAzol	60
3.3.2. Extracción automática de ADN	60
3.4. PCR convencional.....	61
3.5. Determinación y genotipado de polimorfismos	61
3.6. Ensayos de detección de mutaciones somáticas	62
3.7. Técnica de HRM.....	63
3.7.1. Diseño y optimización de los cebadores del gen <i>ATM</i>	64
3.8. Secuenciación automática.....	71
3.9. Cultivo de células primarias.....	72
3.10. Ensayos de co-cultivos con líneas celulares.....	73
3.11. Determinación de la viabilidad celular/apoptosis por citometría de flujo	73
3.12. Análisis de proteínas mediante <i>Western blotting</i>	74
3.13. Análisis estadístico.....	76
4. RESULTADOS	81
4.1. Análisis de la variabilidad genética del gen <i>VEGFA</i> en un estudio caso-control	81
4.1.1. Análisis de las características biológicas entre ambas cohortes.....	81
4.1.1.2. Determinación de las variaciones de interés del gen <i>VEGFA</i>	81
4.1.3. Determinación y distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas	82
4.1.4. Análisis de desequilibrio de ligamiento	83
4.1.5. Análisis de haplotipos	85
4.1.6. Estudios de asociación entre los polimorfismos genéticos y las variables clínicas y moleculares	86
4.2. Análisis de las alteraciones moleculares de los genes <i>ATM</i> , <i>BIRC3</i> , <i>SF3B1</i> y <i>NOTCH1</i> en la supervivencia de pacientes con delección 11q	87
4.2.1. Determinación y distribución de las alteraciones moleculares	87
4.2.2. Análisis de patogenicidad de las variantes detectadas en los genes <i>ATM</i> y <i>BIRC3</i>	89
4.3. Estudio del efecto citotóxico de combinaciones de fármacos y su correlación con alteraciones moleculares de pronóstico adverso.....	92

4.3.1. Análisis del efecto de la combinación de ATO y Forodesina con dGuO en pacientes al diagnóstico y en progresión.....	92
4.3.1.1. Análisis de la citotoxicidad de los fármacos individuales ATO y Forodesina ..	92
4.3.1.2. Efecto citotóxico de ATO en combinación con Forodesina	94
4.3.1.3. Determinación del índice de combinación en la interacción de los fármacos	96
4.3.2. Correlación de las alteraciones moleculares de pronóstico adverso con la respuesta al efecto citotóxico de Forodesina y Fludarabina en combinación con ATO	97
4.4. Artículos	99
Artículo I: Vascular Endothelial Growth Factor A (VEGFA) Gene Polymorphisms Have an Impact on Survival in a Subgroup of Indolent Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia	99
Artículo II. Biallelic ATM alterations detected at diagnosis identify a subset of treatment-naïve chronic lymphocytic leukemia patients with reduced overall survival similar to patients with p53 deletion	108
Artículo III. Arsenic trioxide synergistically potentiates the cytotoxic effect of fludarabine in chronic lymphocytic leukemia cells by further inactivating the Akt and ERK signaling pathways	123
5. DISCUSIÓN	131
6. CONCLUSIONES	147
7. BIBLIOGRAFÍA	149
8. ABREVIATURAS	184

Índice de figuras

Figura 1: Desarrollo del linfocito B y estado de maduración de los genes IgVH.	16
Figura 2: Esquema de las hipótesis del origen celular de la LLC. Modificado de [29].	18
Figura 3: Esquema de las proteínas fosforiladas por ATM en respuesta al daño del ADN.	26
Figura 4: Mutaciones y vía de señalización de SF3B1 en LLC.	30
Figura 5: Mutaciones y vía de señalización de NOTCH1 en LLC.	32
Figura 6: Vías de inducción de apoptosis de tipo intrínseca y extrínseca..	35
Figura 7: Estructura de las proteínas de la familia Bcl-2 según los dominios de homología..	36
Figura 8: Esquema representativo de la unión selectiva e interacción entre las proteínas Bcl-2 más destacadas del grupo de iniciadoras, pro-supervivencia y pro-apoptóticas.	38
Figura 9: Posición genómica de los polimorfismos seleccionados del gen VEGFA.	82
Figura 10: Gráfico del nivel de desequilibrio de ligamiento (LD) entre los polimorfismos del gen VEGFA obtenido mediante el programa Haploview.....	84
Figura 11: Representación esquemática de la proteína ATM y distribución de las mutaciones descritas en función de los dominios funcionales.....	88
Figura 12: Efecto apoptótico inducido por concentraciones crecientes de ATO en células de LLC durante 24 y 48 horas.....	94
Figura 13: Incremento citotóxico por la combinación de Forodesina (Foro) y ATO a 24 horas de cultivo de células de LLC.....	95
Figura 14: Representación gráfica de los índices de combinación a 48 horas de cultivo.	96

Índice de Tablas

Tabla 1: Marcadores pronósticos empleados en el diagnóstico y seguimiento de la LLC.	19
Tabla 2: Clasificaciones de los sistemas de estadiaje clínico de Rai y Binet.	20
Tabla 3: Secuencias de los cebadores del gen <i>VEGFA</i>	61
Tabla 4: Secuencias de los cebadores correspondientes a los exones del gen <i>BIRC3</i>	64
Tabla 5: Secuencias de los cebadores diseñados para la amplificación del gen <i>ATM</i>	65
Tabla 6: Condiciones de PCR-HRM para los exones 2, 3, 4, 5, 9, 11, 13A, 17, 23, 24B, 25A, 25B, 33 y 40.	68
Tabla 7: Condiciones de PCR-HRM para los exones 29A, 28, 41, 27 y 30.	69
Tabla 8: Condiciones de PCR-HRM de los exones 7A, 7B, 10A, 10B, 10C, 12, 18A, 22, 29B, 36A, 36B, 37A, 38, 39, 46A, 46B, 47, 48 y 50A.	69
Tabla 9: Condiciones de PCR-HRM de los exones 13B, 14B, 15, 18b, 26B, 31A, 31B, 42, 43A, 43B, 49A, 50B, 54, 55, 56, 57, 58B, 59, 60, 61, 62, 63A y 63B.	69
Tabla 10: Condiciones de PCR-HRM de diferentes exones del gen <i>ATM</i>	70
Tabla 11: Condiciones de amplificación de la técnica HRM.	71
Tabla 12: Anticuerpos primarios y secundarios empleados en el estudio.	75
Tabla 13: Distribución de las frecuencias genotípicas del gen <i>VEGFA</i> . Polimorfismos estudiados en el grupo de pacientes y el grupo control.	82
Tabla 14: Frecuencias del alelo menor (MAF) del gen <i>VEGFA</i>	83
Tabla 15: Valores de la medida de asociación normalizada del desequilibrio de ligamiento.	84
Tabla 16: Distribución de las frecuencias haplotípicas.	85
Tabla 17: Análisis de asociación en la distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas en el grupo de pacientes y control.	86
Tabla 18: Polimorfismos detectados mediante HRM y validados por secuenciación en regiones codificantes del gen <i>ATM</i>	90
Tabla 19: Polimorfismos detectados mediante HRM y validados por secuenciación, correspondientes a regiones intrónicas del gen <i>ATM</i>	91
Tabla 20: Variantes polimórficas de las regiones exónicas e intrónicas del gen <i>BIRC3</i>	92
Tabla 21: Características clínicas y moleculares de los pacientes con LLC al diagnóstico y con tratamiento previo en función de la resistencia o sensibilidad a fludarabina.	98

Summary

SUMMARY

Introduction

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is the most common form of leukemia in Western countries. It is characterized by clonal proliferation in peripheral blood of resistant apoptosis B lymphocyte having a characteristic immunophenotype defined by the co-expression of CD5 / CD19 and a lower expression of CD20, CD22 and CD79b compared to the normal B lymphocyte. Tumor B lymphocytes, during the progression of the disease, invade the bone marrow and the primary and secondary lymphoid organs. Different clinical, biological and genetic parameters allow categorize patients with CLL. However, the prognostic value of these factors is currently limited by its lack of effectiveness in predicting clinical progression, especially during the early stages of the disease. It is therefore important to identify prognostic markers that are determinants in marked clinical heterogeneity of this leukemia. Similarly, research on survival mechanisms involved in the pathogenesis of CLL can afford to improve the election of new combination therapies in response to adverse prognostic factors and the effect of the resistance of the tumor microenvironment.

Objectives

Based on the previously exposed, this thesis focuses on the identification and analysis of molecular alterations as prognostic factors in diagnosing the disease and also in studying drug combinations to explore resistance mechanisms in response to molecular alterations with adverse prognosis. The work is developed following three main objectives:

- Analysis of the genetic variability of *VEGFA* gene in the prognosis of patients with CLL diagnosis.
- Analysis of the molecular alterations of *ATM*, *BIRC3*, *SF3B1* (K700E) and *NOTCH1* (p.P2515fs * 4) genes in the survival of patients at diagnosis with 11q deletion.

Climate change is a global issue that is the subject of intense research and debate. It is characterized by a long-term increase in the average temperature of the Earth's atmosphere, which is caused by the increase in the concentration of greenhouse gases in the atmosphere. The most common greenhouse gases are carbon dioxide (CO₂), methane (CH₄), and nitrous oxide (N₂O). These gases are released into the atmosphere by human activities, such as the burning of fossil fuels, deforestation, and agriculture. The increase in greenhouse gases has led to a number of observable changes in the climate, including a rise in sea levels, more frequent and severe weather events, and a decrease in the amount of snow and ice on the Earth's surface. The scientific community is in agreement that human activities are the primary cause of climate change, and that it is urgent to take action to reduce greenhouse gas emissions in order to prevent further damage to the planet.

Based on the previous research, the main focus of the study is to investigate the impact of climate change on the environment and society. The study is divided into two main parts: a literature review and a case study. The literature review examines the current state of knowledge on climate change and its effects. The case study focuses on the impact of climate change on the environment and society in a specific region. The study is designed to provide a comprehensive overview of the issue and to identify the key challenges and opportunities for addressing climate change.

The study concludes that climate change is a serious threat to the environment and society. It is essential to take action to reduce greenhouse gas emissions in order to prevent further damage to the planet. The study also identifies the key challenges and opportunities for addressing climate change and provides recommendations for future research and action.

- Study of the cytotoxic effect of drug combinations and their correlation with molecular alterations of adverse prognosis in patients with and without prior treatment.

Methodology

We studied a total of 401 samples of newly diagnosed patients and 40 samples from patients in clinical progression. The samples used were B lymphocytes, obtained from the purification of peripheral blood samples of patients from four hospitals of GLIMCE group: Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda, Hospital Universitario de Getafe, Hospital Universitario Severo Ochoa and Hospital Universitario of Valencia. In all cases, the biological samples from patients and healthy individuals, was performed the genomic DNA extraction using DNAzol or automatically. Biological samples of patients analyzed in this study were grouped into three different studies. In the study the analysis of genetic polymorphisms of the *VEGFA* gene were analyzed 239 newly diagnosed patients. 183 healthy individuals as a control group were also studied. In both groups genotyping *VEGFA* certain gene polymorphisms was performed by real time PCR. In the study of the impact of molecular alterations in patients with 11q deletion, we were analyzed 118 patients at diagnosis and 27 patients in clinical progression.

In this study, we performed the mutational screening of *ATM* and *BIRC3* genes by HRM and subsequent sequencing, while in the *SF3B1* and *NOTCH1* genes, the most common mutations, p.K700E and p.P2515fs*4 were analyzed, respectively, by a detection assay somatic mutations by real time PCR. Finally, the study of drug combinations in patients with adverse prognosis alterations, we studied 35 patients including 21 samples from newly diagnosed patients and 14 patients who received prior treatment. We performed primary cell cultures and co-cultures with two cell lines HS-5 (fibroblastoid) and HS-27A (epithelioid). The effect of ATO, fludarabine and forodesine drugs was determined by flow cytometry using labeling with Annexin V-FITC/IP. The expression of proteins was determined by Western Blotting. In the

effect of the systemic effect of drug combination and their interaction with
 metabolic alterations in adverse response in patients with acute renal
 insufficiency.

Methodology

We studied a total of 401 samples in newly diagnosed patients and 40
 samples from patients in chronic progression. The samples used were 5 lymphocytes
 obtained from the peripheral of peripheral blood samples of patients from two
 hospitals in Chile: Group Hospital Universidad Pontificia de Chile (Universidad
 Hospital Pontificia de Chile), Hospital Universidad de Chile (Hospital
 Universidad de Chile). In all cases, the biological samples from patients and healthy
 individuals were subjected to the same conditions of collection and processing.
 Biological samples of patients included in the study were grouped into three different
 studies. In the study of genetic polymorphisms of the VEGF gene, we
 analyzed 338 newly diagnosed patients, 125 healthy individuals as a control group
 were also included in both groups belonging VEGF polymorphisms were
 performed by real time PCR. In the study of the effect of polymorphisms
 patients with T2D diabetes we were analyzed 115 patients as controls and 25 patients
 in chronic progression.

In this study we performed the statistical screening of ATG and HbA1c
 levels by ANOVA and subsequent regression analysis in the T2D1 and T2D2 groups. We
 used common mutation p.V302L and p.V302L*4 were analyzed separately by a
 deletion assay random mutation by real time PCR. Finally, the study of drug
 combinations in patients with adverse response treatment, we studied 35 patients
 including 21 samples from newly diagnosed patients and 14 patients who received
 prior treatment. We performed genotyping of polymorphisms with two different
 HbA1c (HbA1c) and HbA1c (HbA1c). The effect of ATG, HbA1c and
 HbA1c drug was determined by flow cytometry using labeling with Annexin V
 FITC. The expression of patients was determined by Western Blotting in the

analysis of *VEGFA* gene, and haplotype frequencies analysis it was performed using the Phase program and linkage disequilibrium analysis was performed by Haploview program. The test χ^2 Pearson used for the analysis of association between clinical and / or molecular variables, as well as all statistical analysis of overall survival (OS) and time of first treatment (TTFT), were performed using SPSS 15.0 with a significance level of $p < 0.05$. The CompuSyn program was used in the case of the analysis of the cytotoxic effect of drugs, and the data were analyzed using GraphPad InStat v3.06 program.

Results

Two hundred and thirty nine patients, were analyzed for five polymorphic variants of the gene *VEGF* rs699947 (-1540 C>A), rs833061 (-460 T>C), rs2010963 (405C>G), rs25648 (1032C>T) and rs3025039 (1689C>T). We detected allele, genotypic and haplotypic frequencies, between the patients group and the group of healthy subjects ($n = 183$). Later, in a recessive genetic model it was detected that the ACG haplotype in homocigosis (genotype ACG^{+/+}) comprised of gene variants *VEGF* rs699947/rs833061/rs2010963, was correlated with lower OS compared to other genotypes ACG^{-/-} (HR: 2.3; $p = 0.002$). Furthermore, multivariate analysis identified the genotype ACG^{+/+} as a new independent prognostic factor (HR: 2.1, $p = 0.005$). We found that this genotype could subdivide patients with indolent variables in subgroups of different prognosis. Specifically, patients with IgVH-M (HR: 3.5, $p = 0.035$) genes, with a genetic low or very low risk (HR: 3.4, $p = 0.001$), with initial clinical stages (HR: 2.2, $p = 0.035$), negative expression of CD38 (HR: 3.4, $p = 0.0001$) and with an age to diagnosis less than 65 years (HR: 3.1, $p = 0.009$), showed a decrease of OS associated with the presence of genotype ACG^{+/+}.

Moreover, in the study of the molecular alterations, we found that 14/118 (11.8%) and 7/118 (5.9%) patients had mutations in the *ATM* and *BIRC3* genes, respectively. Regarding the *NOTCH1* (p.P2515fs*4) and *SF3B1* (p.K700E) genes, mutations were detected in 14/118 (11.8%) and 10/118 (8.5%) patients, respectively.

In analyzing the impact of changes in the *ATM* gene in patients with 11q deletion, patients with both alterations (biallelic inactivation of the *ATM* gene) had a similar TTFT and lower OS compared to patients with 11q deletion isolation and shorter TTFT and OS when compared to patients with wild type *ATM*. In the multivariate analysis, it was identified that biallelic inactivation of the *ATM* gene was significantly associated (HR: 6.4, $p < 0.007$) with a similar risk of death to that described in patients with p53 deletion (HR: 6.1, $p < 0.004$). This risk also was higher than identified in patients who only had 11q deletion (HR: 2.8, $p < 0.022$) and other variables known adverse prognostic such as age, advanced clinical stage and complex karyotype. By contrast, in patients with the diagnosis *BIRC3* gene mutation and deletion 11q, no influence was detected in the TTFT and OS in the multivariate analysis.

Finally, in the analysis of the drug combination, we detected an additive interaction among combinations with ATO and fludoesine and a synergistic combination in the interaction between ATO and Fludarabine. In addition, patients showed less cytotoxic response to fludarabine *in vitro* assays, ATO potentiated the effect of fludarabine in previously untreated patients and progression, significantly decreasing cell viability. To further explore the biological mechanisms of this interaction were analyzed proteins involved in the survival of CLL cells. It showed that the combination of ATO and fludarabine to a selected dose, significantly decreased the expression of Akt and ERK, and the ratio of Bcl-2/Bax and Mcl-1/Bim, compared to the action of drugs individual. Furthermore, analysis of cellular resistance favored by the microenvironment, the combination of ATO and partially acted on Fludarabine resistance stromal cells on CLL cells induced.

Conclusions

CLL patients with ACG ^{+/+} genotype had lower survival compared to other genotypes. In fact, ACG ^{+/+} genotype was identified as an independent prognostic marker in the study cohort, capable of subdividing patients with indolent variables in subgroups with different prognosis. Interaction at low ATO with fludarabine

concentrations, sensitizes resistant cells to Fludarabine, by a lower expression of ERK and Akt as well as the decrease in anti-apoptotic Bcl-2 and Mcl-1 proteins, and additionally can partially act on the pro-survival effect induced stromal cells. Overall, the detection in early stages of CLL, polymorphic variants of *VEGFA* gene and mutations of the *ATM* gene in patients with 11q deletion, along with other factors, could be useful as prognostic markers in clinical practice. Furthermore, the study of ATO and fludarabine appears as effective for investigating mechanisms of resistance especially in CLL patients refractory to fludarabine therapy.

Resumen

Resumen

RESUMEN

Introducción

La leucemia linfocítica crónica (LLC) es la forma más común de leucemia en los países occidentales. Se caracteriza por la proliferación clonal en sangre periférica de linfocitos B resistentes a la apoptosis que presentan un inmunofenotipo característico definido por la co-expresión de CD5/CD19 y una menor expresión de CD20, CD22 y CD79b comparado con un linfocito B normal. Los linfocitos B tumorales, durante la progresión de la enfermedad, invaden la médula ósea y los órganos linfoides primarios y secundarios. Los diferentes parámetros clínicos, biológicos y genéticos permiten categorizar a los pacientes con LLC. Sin embargo, el valor pronóstico de estos factores actualmente es limitado, por su falta de eficacia para predecir la progresión clínica, principalmente durante las etapas iniciales de la enfermedad. Por tanto, es importante la identificación de marcadores pronósticos que sean determinantes en la marcada heterogeneidad clínica de esta leucemia. Del mismo modo, la investigación sobre los mecanismos de supervivencia implicados en la patogénesis de la LLC, puede permitir mejorar la elección de nuevas terapias combinadas en respuesta a factores de pronóstico adverso y al efecto de la resistencia del microambiente tumoral.

Objetivos

En base a lo anteriormente expuesto, la presente tesis doctoral se centra en la identificación y análisis de alteraciones moleculares como factores pronósticos en el diagnóstico de la enfermedad, y en el estudio de combinaciones de fármacos para explorar mecanismos de resistencia en respuesta a alteraciones moleculares de pronóstico adverso. El trabajo realizado se desarrolla siguiendo tres objetivos principales:

- Análisis de la variabilidad genética del gen *VEGFA* en el pronóstico de los pacientes con LLC al diagnóstico.

- Análisis de las alteraciones moleculares de los genes *ATM*, *BIRC3*, *SF3B1* (K700E) y *NOTCH1* (p.P2515fs*4) en la supervivencia de pacientes al diagnóstico con delección 11q.
- Estudio del efecto citotóxico de combinaciones de fármacos y su correlación con alteraciones moleculares de pronóstico adverso en pacientes con y sin tratamiento previo.

Metodología

Se han estudiado un total de 401 muestras de pacientes recién diagnosticados y 40 muestras de pacientes en progresión clínica. Las muestras empleadas fueron linfocitos B obtenidos a partir de la purificación de muestras de sangre periférica de pacientes provenientes cuatro hospitales del grupo GLIMCE: Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda, Hospital Universitario de Getafe, Hospital Universitario Severo Ochoa de Madrid y Hospital Universitario General de Valencia. En todos los casos, a las muestras biológicas de los pacientes y de los individuos sanos se realizó la extracción del ADN genómico mediante DNAzol o de forma automática. Las muestras biológicas de los pacientes analizados en este trabajo se agruparon en tres estudios diferentes. En el estudio del análisis de los polimorfismos genéticos del gen *VEGFA* se analizaron 239 pacientes recién diagnosticados. También se estudiaron 183 individuos sanos como grupo control. En ambos grupos se realizó el genotipado de determinados polimorfismos del gen *VEGFA* mediante PCR a tiempo real. En el estudio del impacto de las alteraciones moleculares en pacientes con delección 11q se analizaron un total de 118 pacientes al diagnóstico y 27 pacientes en progresión. En este ensayo se realizó el cribado mutacional de los genes *ATM* y *BIRC3* mediante HRM y posterior secuenciación, mientras que en los genes *SF3B1* y *NOTCH1*, se analizaron las mutaciones más frecuentes, p.K700E y p.P2515fs*4, respectivamente, mediante un ensayo de detección de mutaciones somáticas por PCR a tiempo real. Por último, en el estudio de las combinaciones de fármacos en pacientes con alteraciones de pronóstico adverso, estudiamos 35 pacientes incluyendo 21 muestras de pacientes recién diagnosticados y 14 de pacientes que recibieron tratamiento previo. Se realizaron

cultivos de células primarias y co-cultivos con dos líneas celulares HS-5 (fibroblastoide) y HS-27A (epiteliode). El efecto de los fármacos ATO, fludarabina y Forodesina se determinó por citometría de flujo mediante el marcaje con Anexina V-FITC/IP. La expresión de las proteínas se determinó por *Western Blotting*. En el análisis del gen *VEGFA*, el análisis haplotípico y de sus frecuencias se realizó mediante el programa *Phase* y el análisis del desequilibrio de ligamiento se realizó mediante el programa *Haploview*. El test χ^2 de *Pearson* empleado para el análisis de asociación entre las variables clínicas y/o moleculares, así como todos los análisis estadísticos de supervivencia global (SG) y del tiempo libre de tratamiento (SLT), fueron realizados mediante el programa estadístico SPSS 15.0 con un nivel de significancia de $p < 0.05$. En el caso del análisis del efecto citotóxico de los fármacos, se utilizó el programa *CompuSyn* y los datos fueron analizados mediante el programa *GraphPad InStat v3.06*.

Resultados

Se analizaron en 239 pacientes, cinco variantes polimórficas del gen *VEGFA* rs699947 (-1540 C>A), rs833061 (-460T>C), rs2010963 (405C>G), rs25648 (1032C>T) y rs3025039 (1689C>T). Se detectaron frecuencias alélicas, genotípicas y haplotípicas similares entre el grupo de pacientes y el grupo de individuos sanos ($n=183$). Posteriormente, en un modelo genético recesivo se detectó que el haplotipo ACG en homocigosis (genotipo $ACG^{+/+}$) conformado por las variantes del gen *VEGFA* rs699947/rs833061/rs2010963, fue correlacionado con una menor SG comparado a otros genotipos $ACG^{-/x}$ (HR: 2.3; $p=0.002$). De forma destacada, en el análisis multivariante identificamos al genotipo $ACG^{+/+}$ como un nuevo factor pronóstico independiente (HR: 2.1, $p=0.005$). Detectamos que este genotipo, podía subdividir a pacientes con variables de curso indolente en subgrupos de diferente pronóstico. Concretamente, pacientes con genes IgVH-M (HR: 3.5, $p = 0.035$), con una genética de bajo o muy bajo riesgo (HR: 3.4, $p = 0.001$), con estadios clínicos iniciales (HR: 2.2, $p = 0.035$), expresión negativa de CD38 (HR: 3.4, $p = 0.0001$) y con una edad al diagnóstico inferior a 65 años (HR: 3.1, $p = 0.009$), presentaron una disminución de la SG asociada a la presencia del genotipo $ACG^{+/+}$.

Por otra parte, en el estudio de las alteraciones moleculares, detectamos que 14/118 (11.8%) y 7/118 (5.9%) pacientes presentaron mutaciones en los genes *ATM* y *BIRC3*, respectivamente. En relación a los genes *NOTCH1* y *SF3B1*, las mutaciones fueron detectadas en 14/118 (11.8%) y 10/118 (8.5%) pacientes, respectivamente. En el análisis del impacto de las alteraciones del gen *ATM* en los pacientes con delección 11q, los pacientes con ambas alteraciones (inactivación bialélica del gen *ATM*) presentaron una similar SLT y una menor SG en comparación con pacientes con delección 11q de forma aislada. Por otro lado, presentaron una disminución de la SLT y de la SG en comparación con los pacientes que no presentaron ninguna alteración (*ATM wild type*). En el análisis multivariante, se identificó que la inactivación bialélica del gen *ATM* fue asociada significativamente (HR: 6.4, $p < 0.007$) con un riesgo de muerte similar al descrito en los pacientes con delección p53 (HR: 6.1, $p < 0.004$). Este riesgo, además fue superior al identificado en pacientes que sólo presentaron delección 11q (HR: 2.8, $p < 0.022$) y al de otras variables conocidas de pronóstico adverso como la edad, el estadio clínico avanzado y el cariotipo complejo. Por el contrario, en pacientes al diagnóstico con mutación del gen *BIRC3* y delección 11q, no se detectó ninguna influencia en la SLT y en la SG en el estudio multivariante.

Por último, en el análisis de la combinación de fármacos, detectamos una interacción aditiva entre las combinaciones con ATO y forodesina y una combinación sinérgica en la interacción entre ATO y fludarabina. Además, en pacientes que presentaron una menor respuesta citotóxica a fludarabina en los ensayos *in vitro*, ATO potenció el efecto de la fludarabina, en pacientes sin tratamiento previo y en progresión, disminuyendo la viabilidad celular significativamente. Para profundizar en los mecanismos biológicos de esta interacción se analizaron proteínas involucradas en la supervivencia de las células de LLC. Se mostró que la combinación de ATO y fludarabina a una dosis seleccionada, disminuyó de forma significativa la expresión de Akt y ERK, así como el ratio de Bcl-2/Bax y Mcl-1/Bim, en comparación a la acción de los fármacos individuales. Además, en el análisis de la resistencia celular favorecida por

el microambiente, la combinación de ATO y Fudarabina actuó parcialmente sobre la resistencia inducida por las células del estroma sobre las células de LLC.

Conclusiones

Los pacientes de LLC con el genotipo $ACG^{+/+}$ presentaron una menor supervivencia comparada a otros genotipos. De hecho, el genotipo $ACG^{+/+}$ se identificó como un marcador pronóstico independiente en la cohorte de estudio, capaz de subdividir a los pacientes con variables de curso indolente en subgrupos con diferente pronóstico. La interacción de en bajas concentraciones ATO con fludarabina, sensibiliza a las células resistentes a fludarabina, mediante una menor expresión de ERK y AKT, así como de la disminución de las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2 y Mcl-1, y además, puede actuar parcialmente sobre el efecto de pro-supervivencia inducido por las células estromales. En conjunto, la detección en etapas iniciales de la LLC, de variantes polimórficas del gen *VEGFA* y mutaciones del gen *ATM* en pacientes con delección 11q, junto a otros factores, podría ser de utilidad como marcadores pronósticos en la práctica clínica. Además, el estudio de ATO y fludarabina, se presenta como una combinación eficaz para investigar mecanismos de resistencia especialmente en pacientes resistentes a fludarabina.

Introducción

Introduction

1. INTRODUCCIÓN

1.1. Características principales de la leucemia linfocítica crónica (LLC)

La LLC se caracteriza por la proliferación clonal en sangre periférica (>5000 linfocitos/ μ l) de linfocitos B resistentes a la apoptosis y con un inmunofenotipo característico [1, 2]. Estas células leucémicas son morfológicamente maduras pero presentan un inmunofenotipo característico definido por la expresión de antígenos (Ags) específicos de células B como CD19 y CD23, la expresión del antígeno de célula T CD5 y una menor expresión de CD20, CD22 y CD79b comparado con un linfocito B normal. Durante la evolución de la enfermedad, las células tumorales (células de LLC) proliferantes, progresivamente invaden la médula ósea y los órganos linfoides primarios y secundarios [3, 4]. Los linfocitos B tumorales se acumulan progresivamente en la médula ósea y su infiltración se produce siguiendo un patrón de crecimiento nodular, intersticial o difuso. Por otra parte, a nivel ganglionar se observan otros patrones de crecimiento, como el crecimiento pseudofolicular, el más frecuente en los ganglios linfáticos de los pacientes [5].

La LLC es una enfermedad incurable con un curso clínico muy heterogéneo. La mitad de los pacientes presentan un curso indolente de la enfermedad pudiendo permanecer asintomáticos y sin tratamiento durante décadas con una expectativa de vida similar a la de la población general normal, mientras que la otra mitad de los pacientes van a requerir tratamiento a lo largo de la evolución de la LLC. A pesar de que con los tratamientos actuales se consiguen tasas de respuesta elevadas, muchos pacientes recaen a lo largo de la evolución de la misma. La falta de un tratamiento curativo, la prolongada secuencia de respuestas-recaídas, así como su prevalencia en poblaciones de edad avanzada con comorbilidades asociadas, influyen en la ausencia de tratamientos estándares para cada una de las situaciones que plantea la enfermedad [6-8]. Actualmente, es el síndrome linfoproliferativo más común en los adultos de países occidentales, comprendiendo aproximadamente el 11% de todas las neoplasias hematológicas y el 24% de todas las leucemias [2, 9, 10]. La incidencia en poblaciones asiáticas y afroamericanas frente a países occidentales es

significativamente menor, representando entre el 5-10% de las leucemias. Además, esta incidencia se mantiene incluso ante los movimientos migratorios, descartándose cualquier hipótesis de factores ambientales de predisposición [11, 12].

Se presenta al diagnóstico con mayor frecuencia en varones que en mujeres (1.7:1), con una edad mediana entre 68 y 72 años y con una incidencia de 4-5 casos por cada 100.000 habitantes/año [13, 14]. La incidencia aumenta con la edad, siendo poco frecuente su aparición antes de los 50 años. Sin embargo, en la actualidad se han incrementado los casos con diagnóstico temprano (alrededor de un 20%), al realizarse un mayor número de analíticas de sangre rutinarias en individuos que se presentan totalmente asintomáticos [13, 15].

1.2. Desarrollo del linfocito B tumoral en la LLC

1.2.1. Ontogenia del linfocito B

Las células o linfocitos B forman parte del sistema inmune adaptativo y derivan de un precursor pluripotente, la célula madre hematopoyética (HSC), presente fundamentalmente en la médula ósea, donde también se generan las células B con receptores de antígeno funcionales (BCRs) que posteriormente adquirirán competencia inmunológica [16]. La respuesta de la célula B durante el reconocimiento antigénico es mediada a través de la región variable (V) de las cadenas pesadas (VH) y ligeras (VL) de la inmunoglobulina (Ig) que conforma el BCR. Cada célula B presenta un BCR distinto, formado por combinaciones variables de diferentes segmentos. El dominio VL está codificado por dos genes diferentes (V_L y V_J), mientras que el dominio VH está codificado por tres genes diferentes: V_H , D_H y J_H [17, 18, 19].

En el primer paso de todo el proceso de maduración, las HSCs pueden diferenciarse a un tipo celular muy precoz denominado células pro-B. En este estadio se producen los primeros reordenamientos del dominio VH que en asociación con otros componentes, conducen a la formación del pre-BCR, que identifica el siguiente estado de maduración denominado célula pre-B [20, 21]. Posteriormente, se produce el reordenamiento de los genes de las cadenas ligeras, pasando al estadio B inmaduro

que expresa IgM en la superficie celular [1, 20]. En este estadio, el linfocito B expresa el BCR en su membrana y los mecanismos de control se orientan hacia alcanzar la especificidad de este receptor, evaluándose su capacidad de reconocer moléculas propias en el ambiente medular, proceso conocido como inducción de tolerancia central B. Si no recibe ninguna señal a través del BCR, el linfocito B emigra desde la médula ósea para continuar con su desarrollo. Cuando los linfocitos B alcanzan la madurez sintetizan IgD, co-expresado en su membrana junto a la IgM [20], abandonan la médula ósea y entran en sangre periférica. Estas células B se definen como células vírgenes o naïve, porque aún no han entrado en contacto con antígenos, están presentes en estado de reposo en la fase G0 del ciclo celular y constituyen entre un 5-15% de la población linfocitaria circulante [22, 23].

Seguidamente, los linfocitos B migran a órganos linfoides secundarios donde serán expuestos a antígenos en los centros germinales (CGs) de los folículos linfoides secundarios (Figura 1). Previamente, en el CG la secuencia de genes que codifican la porción variable de las cadenas pesadas (V_H) y ligeras (V_L) sufre una elevada tasa de mutaciones, proceso denominado hipermutación somática (SHM), que aumenta el repertorio del BCR por la introducción de mutaciones. De esta manera, cada etapa del proceso de maduración del linfocito B se caracteriza por el estado de recombinación de los genes de las cadenas pesadas y ligeras de las inmunoglobulinas, así como por la expresión de determinadas proteínas en la superficie celular [1, 17-19]. En el CG se seleccionan los linfocitos B con mutaciones que incrementen la afinidad de sus receptores BCR por el antígeno (células con mutaciones de baja afinidad o autorreactivas morirán por apoptosis) [21]. Para el inicio de la proliferación y diferenciación del linfocito B, el primer paso en su activación es el reconocimiento antigénico por parte del BCR, sólo en los linfocitos B que previamente han sido seleccionados al presentar una mayor afinidad por el antígeno. Posteriormente, reconocen antígenos presentados por células del microambiente como las células dendríticas foliculares (FDCs), lo procesan y expresan en superficie los péptidos derivados del antígeno, a través de moléculas de clase II del complejo mayor de histocompatibilidad (MHC-II). Estos péptidos son reconocidos por linfocitos T

específicos que también conforman parte del microambiente celular. De esta manera, los linfocitos B experimentan múltiples rondas de proliferación, hipermutación somática y selección antes de ser finalmente diferenciados a células antígeno-específicas, como células B memoria y células plasmáticas [19, 21, 23, 24].

Cuando en el proceso de reconocimiento antigénico se requiere la participación de linfocitos T dentro del CG, se denomina respuesta inmune T-dependiente. Sin embargo, el proceso de estimulación antigénica también puede ocurrir en ausencia de células T y fuera del CG, en la zona marginal de los folículos linfoides en una respuesta inmune T-independiente (Figura 1). En esta fase, el linfocito B se pone en contacto con el Ag sin colaboración del linfocito T, dando lugar a células plasmáticas que producen anticuerpos de baja afinidad. Además, se produce la recombinación de los segmentos de las Igs, pero no el proceso de HSM [22]. Por otra parte, las células B maduras que no reciban estimulación antigénica, presentan el reordenamiento de los genes de las Igs, pero no HSM, y pasan a formar parte de una fracción de células B en los folículos primarios y en la zona del manto, hasta que reciban el estímulo correspondiente [1, 8].

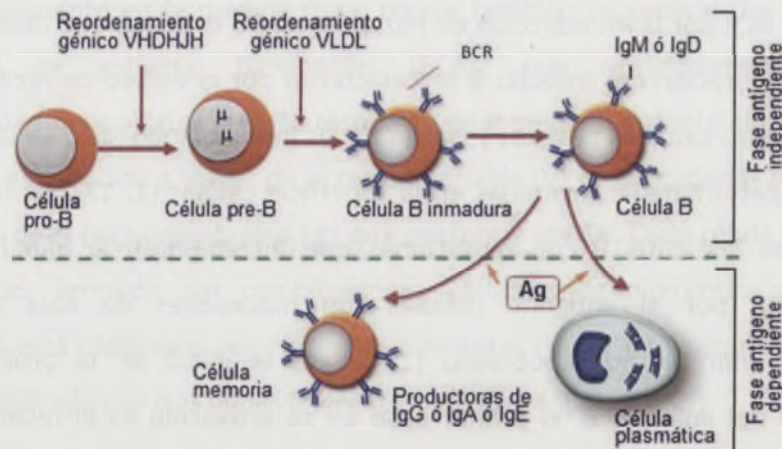


Figura 1: Desarrollo del linfocito B y estado de maduración de los genes IgVH.

1.2.2. Origen del linfocito B en la LLC

La comprensión de la biología de la LLC ha cambiado durante la última década. Diferentes análisis del perfil de expresión génica (PEG) y estudios inmunogenéticos han

proporcionado información relevante sobre su origen celular, del que aún existen diversos aspectos por resolver, necesarios para comprender la patogénesis y evolución de la enfermedad. Como se ha descrito, durante el desarrollo y diferenciación normal de los linfocitos B, ocurre una gran variedad de cambios en los genes de las inmunoglobulinas, como la adquisición de mutaciones somáticas. Cuando la secuencia de los genes de la región variable de las cadenas pesadas de las inmunoglobulinas (IgVH) varía en más de un 2% con respecto a la secuencia germinal, se considera que los pacientes presentan genes IgVH mutados (IgVH-M); si varía menos de un 2%, se considera que no presentan mutación (IgVH-UM). Aproximadamente, entre el 60-65% de los pacientes presentan mutaciones en los genes IgVH (LLC-M), mientras que un 35-40% de los pacientes no presentan mutación (LLC-UM) (13,15). De esta manera, la importancia de la presencia o ausencia de mutaciones en los genes IgVH ha influenciado la comprensión del origen celular de la LLC y ha conducido a la argumentación de diferentes hipótesis sobre su desarrollo tumoral [25-30].

Una de ellas propone que las mutaciones oncogénicas pueden iniciarse en etapas tempranas y que el primer evento de la transformación leucémica podría ocurrir en etapas tempranas de diferenciación, tales como las células madre hematopoyéticas (HSCs). Se han descrito experimentos en ratones inmunodeficientes que muestran que HSCs provenientes de pacientes con LLC producen un incremento en la proporción de células pro-B policlonales y eventualmente poblaciones de células B monoclonales y oligoclonales con características de una linfocitosis B monoclonal (LBM). Estos datos implicarían la presencia de lesiones genéticas y epigenéticas en las células HSC [16]. En la misma línea, alteraciones genéticas asociadas a LLC han sido detectadas en progenitores multipotentes de pacientes con LLC, lo que sugiere también la participación de precursores inmaduros en la patogénesis de la LLC. La adquisición de estas lesiones junto con la estimulación antigénica puede llevar a la selección y expansión de células B maduras, con la generación de poblaciones oligoclonales. Así, otros estudios del PEG proponen a las células B memoria como el origen celular del clon tumoral [26,27]. Estas investigaciones muestran que las células de LLC con IgVH-M presentan un PEG similar al de las células B memoria CD5+CD27+

que han pasado por el CG (post-CG) y que derivan de un contexto de estimulación inmune T-dependiente (TD). Por otra lado, las células de LLC IgVH-UM presentan un PEG similar al de células B CD5+CD27-, por lo que se ha propuesto que puede derivar de células B *naïve* o vírgenes, de un linaje precursor de células B o de una célula B memoria que no ha pasado por el CG (pre-CG) dentro de un contexto de estimulación inmune T-independiente (TI) [28-30] (Figura 2).

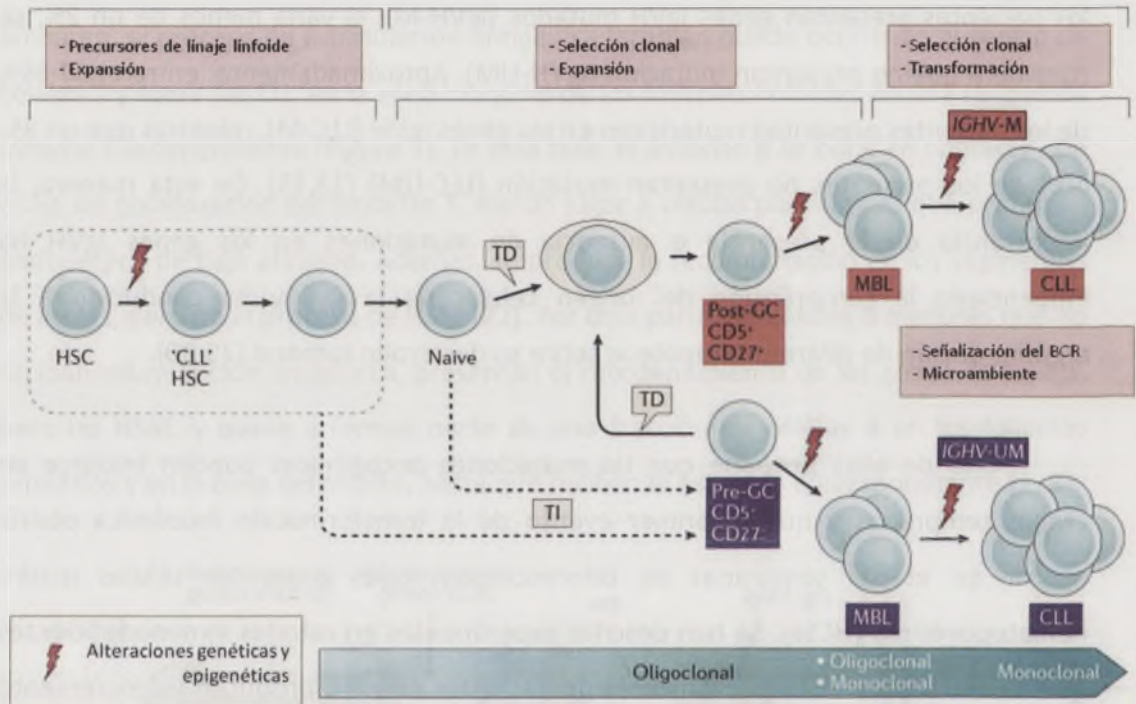


Figura 2: Esquema de las hipótesis del origen celular de la LLC. Modificado de [29].

Sin embargo, se siguen estudiando diferentes hipótesis dado que el proceso de génesis tumoral es un proceso de múltiples etapas. Desde una linfocitosis B monoclonal (LBM), la acumulación de alteraciones genéticas y epigenéticas, así como la estimulación del BCR con antígenos y componentes del microambiente también pueden contribuir a originar el precursor de las células de LLC y a la expansión y transformación del clon leucémico monoclonal [29, 30].

1.3. Marcadores pronósticos en la LLC

Analizando históricamente la evolución de los factores pronósticos, durante la década de 1980, se desarrollaron diferentes marcadores clásicos basados en la presencia de diferentes factores clínicos o morfológicos. Sin embargo, a partir de la década de los noventa y hasta la actualidad, se han identificado diversos factores inmunofenotípicos, citogenéticos y moleculares (Tabla 1).

Tabla 1: Marcadores pronósticos empleados en el diagnóstico y seguimiento de la LLC.

MARCADORES CLÍNICOS CLÁSICOS			
Estadio clínico Binet/Rai		Bajo riesgo Riesgo intermedio Riesgo elevado	Rai 0, Binet A; Rai I-II, Binet B, Rai III-IV, Binet C
Patrón de infiltración de médula ósea		Adverso	Difuso
Recuento linfocitario y tiempo de duplicación (TDL)		Adverso	Recuento linfocitario: >50 x 10 ⁹ linfocitos/L TDL: <12 meses
Marcadores séricos		Adverso	Elevada expresión: β2-microglobulina sérica (β2-M), Timidina kinasa sérica (sTK), CD23 soluble (sCD23)
MARCADORES DE EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS			
Expresión de ZAP-70 y CD38		Adverso	ZAP-70 (>20%) CD38 (>30%)
MARCADORES GENÉTICOS Y MOLECULARES			
Estado mutacional de los genes IgVH		Adverso Favorable	IgVH-UM IgVH-M
Alteraciones citogenéticas	Deleción 13q14 (forma aislada)	Favorable	Deleción de los genes miR15a y miR16-1
	Trisomía 12	Intermedio	Forma aislada: Respuesta favorable en tratamientos con químio-inmunoterapia vs tratamiento convencional
	Deleción 11q22-q23	Adverso	Deleción del <i>gen</i> ATM
	Deleción 17p13	Adverso	Deleción del <i>gen</i> TP53
	Complejidad genómica	Adverso	Tres o más alteraciones genómicas: deleciones y/o ganancias
Nuevas mutaciones	Gen <i>BIRC3</i>	Adverso	Deleción y/o mutación
	Gen <i>SF3B1</i>	Adverso	Mutaciones <i>missense</i> las más frecuentes
	Gen <i>NOTCH1</i>	Adverso	Mutaciones <i>frameshift</i> las más frecuentes

Abreviaciones: IgVH-UM, IgVH no mutado; IgVH-M, IgVH mutado

1.3.1. Marcadores clínicos clásicos

1.3.1.1. Sistema de clasificación Rai / Binet

Los sistemas de estadiaje clínico de Rai y Binet, representaron el primer sistema de estratificación con valor pronóstico en la LLC [33, 34]. Ambos sistemas coinciden en

la identificación de etapas clínicas que consideran el volumen-número de compartimentos ganglionares afectados por la enfermedad y el efecto de la infiltración de la médula ósea. Permiten la clasificación de los pacientes en grupos de riesgo: inicial o bajo (Rai 0, Binet A), intermedio (Rai I-II, Binet B) y alto (Rai III-IV, Binet C), con diferente correlación en la supervivencia global (SG) [35, 36]. Las características principales de cada etapa se describen en la Tabla 2. Una de las deficiencias más importantes de estos sistemas, es la falta de uniformidad en el curso de la enfermedad que presentan los pacientes de un mismo estadio. Por tanto, estos sistemas no son capaces de predecir la progresión de los pacientes principalmente en las etapas iniciales de la enfermedad [26], siendo esto fundamental, ya que más del 80% de los pacientes diagnosticados están en el estadio Rai 0/Binet A [27].

Tabla 2: Clasificaciones de los sistemas de estadiaje clínico de Rai y Binet.

Riesgo	Clasificación BINET		Clasificación RAI		Supervivencia ^a
Bajo	A	Sin anemia (Hb \geq 100 g/L) ni trombocitopenia (plaquetas \geq 100 x 10 ⁹ /L) y < 3 áreas linfoides afectadas	0	Linfocitosis ^b en área periférica y MO	\geq 10
			I	Linfocitosis y adenopatías	7 a 9
Intermedio	B	Sin anemia, ni trombocitopenia y \geq 3 áreas linfoides afectadas ^c	II	Linfocitosis con esplenomegalia con o sin adenopatías	
			III	Linfocitosis, anemia ^e con o sin adenopatías, esplenomegalia o hepatomegalia	
			IV	Linfocitosis, trombocitopenia ^f con o sin anemia, esplenomegalia, adenopatías o hepatomegalia	2 a 4
Alto	C	Anemia ^d o trombocitopenia y > 3 áreas linfoides afectadas			

^a Supervivencia en años, ^b Linfocitosis $>5 \times 10^9/L$ en sangre periférica, ^c Cada área cervical, axilar e inguinal unilateral o bilateral), la esplenomegalia y la hepatomegalia suponen un área ganglionar (5 áreas en total), ^d Anemia en el estadio Binet definida por Hb $<100g/L$, ^e Anemia definida en el estadio RAI por Hb $<110g/L$, ^f Trombocitopenia con plaquetas $<100 \times 10^9/L$.

1.3.1.2. Patrón de infiltración de médula ósea

El patrón de infiltración de linfocitos en la médula ósea, no suele requerirse para el diagnóstico de la enfermedad, aunque, puede proporcionar información relevante antes del inicio del tratamiento. Puede ser de tipo nodular, intersticial, mixto (el caso más frecuente) o difuso, y se ha asociado con un pronóstico adverso. Las investigaciones sobre si el patrón y el grado de infiltración actúan como factores independientes, son controvertidas. Existen estudios que sugieren que el patrón de infiltración difuso no es un factor de pronóstico adverso [38]. Sin embargo, en otros, se ha asociado con genes IgVH-UM y con sobreexpresión de ZAP-70 [39].

1.3.1.3. Recuento linfocitario y tiempo de duplicación

Un recuento linfocitario elevado $>50 \times 10^9$ linfocitos/L, ha sido considerado como un factor pronóstico adverso. Por otra parte, el tiempo de duplicación linfocitaria (TDL) se utiliza como un indicador de progresión en la enfermedad. Cuando el tiempo para la duplicación de los linfocitos es mayor (>12 meses), indica un pronóstico favorable, mientras que los casos agresivos muestran un menor tiempo de duplicación (<12 meses) [28]. Sin embargo, clínicamente hay muchos factores que afectan la tasa de crecimiento de las células tumorales, por tanto el TDL no puede ser considerado como un parámetro único, sino que necesita ser evaluado en el contexto de otros factores pronósticos [3].

1.3.1.4. Marcadores séricos

Los tres marcadores séricos más importantes en los pacientes con LLC son la β_2 -microglobulina sérica (β_2 -M), la timidina kinasa sérica (sTK) y el CD23 soluble (sCD23) [25]. La β_2 -M es una proteína extracelular, componente del complejo HLA de tipo I y marcador de enfermedad activa en diferentes neoplasias e infecciones. Está presente en pequeñas cantidades en el suero y orina de individuos sanos. Altas concentraciones de β_2 -M se han correlacionado con etapas clínicas avanzadas, con elevada carga tumoral y expresión de CD38 y ZAP70 [41, 42]. Se ha considerado como factor pronóstico independiente para la supervivencia libre de tratamiento (SLT) y global en ensayos clínicos en pacientes en primera línea con FCR (fludarabina, ciclofosfamida y

rituximab) [42]. La sTK es una enzima implicada en la ruta de síntesis del ADN. Elevadas cantidades de sTK se correlacionan también con etapas clínicas avanzadas y progresión de la enfermedad [43]. Por otro lado, el sCD23 es una proteína derivada del antígeno CD23 de la membrana de la célula B y elevados niveles de esta proteína se han asociado con infiltración medular de tipo difuso, elevada carga tumoral y menor TDL [44]. El estudio de estos marcadores séricos presenta limitaciones debido a que sus valores de medición no son totalmente reproducibles entre los diferentes laboratorios clínicos. Además, se ha observado que los valores pueden estar influenciados por condiciones externas al curso de la LLC.

1.3.2. Marcadores de expresión de proteína

1.3.2.1. Expresión de ZAP-70 y CD38

En la década de los 90 se identificaron dos marcadores pronósticos independientes, la proteína tirosin-kinasa de 70 KDa (ZAP-70) y el antígeno de superficie CD38. ZAP-70, es un miembro de la familia de las kinasas Scr, que se asocia con la cadena zeta del receptor de la célula T (TCR) o con los receptores Fc de las IgG en las células NK. Normalmente se expresa en células T y NK normales, en las que inicia vías de señalización de la célula T provocando la activación, diferenciación, proliferación y funciones efectoras de la célula en respuesta a la estimulación del TCR. Está ausente en células B normales, pero se expresa en células B de la LLC [45], se asocia con genes IgVH-UM y con la expresión de CD38 [46]. Sin embargo, aún resta por investigar sobre su compleja función en la biología de la célula B tumoral. Se ha correlacionado con un aumento de la señalización del BCR, aumentando así la capacidad de las células leucémicas de responder a los antígenos, lo que podría contribuir a una clínica más agresiva de la enfermedad [45]. Impulsa la infiltración de linfocitos B leucémicos hacia la médula ósea mediante el incremento de la adhesión celular y de la capacidad de migración [47, 48]. Su expresión parece ser constante durante el curso de la enfermedad y es fácilmente evaluable mediante citometría de flujo [49]. Diferentes estudios muestran que una expresión superior al 20%, predice una disminución de la supervivencia libre de progresión (SLP), SLT y SG [50-52]. Aunque, otros estudios concluyen que la positividad de ZAP-70 (>20%) no proporciona

información pronóstica independiente cuando es comparada con otras variables más robustas como CD38 y el estatus mutacional de los genes IgVH [50].

Por otra parte, CD38 es una glicoproteína transmembrana de tipo II, regulada por el microambiente tumoral y con una importante función en la activación de linfocitos, proliferación y protección frente a la apoptosis [29]. La unión de CD38 a su ligando CD31, expresado en células estromales del microambiente de la médula ósea y de los tejidos linfoides secundarios, incrementa la proliferación y supervivencia celular, debido a la inducción de señales de activación y diferenciación en los linfocitos B tumorales [54]. Una expresión de CD38 superior al 30%, se ha asociado significativamente con estadios clínicos avanzados, elevada incidencia de linfadenopatías, hepatomegalia, disminución del TDL, IgVH-UM, así como también, menor respuesta a las terapias y disminución de la SLT, SLP y SG [55-58].

1.3.3. Marcadores genéticos en LLC

1.3.3.1. Estado mutacional de los genes IgVH

Pacientes con genes IgVH-M, se asocian a estadios clínicos tempranos (Binet A), delección 13q (como única anormalidad) y a un pronóstico favorable [59]. Por el contrario, pacientes con IgVH-UM se han asociado con una elevada expresión de CD38, ZAP70 y con una tendencia a la adquisición de alteraciones citogenéticas desfavorables como las delecciones 11q y 17p, lo que conlleva la presentación de estadios clínicos más avanzados y a un curso más agresivo de la enfermedad [60-61]. Además, la supervivencia global en pacientes con IgVH-UM es significativamente menor en comparación a pacientes con IgVH-M [62, 63].

Actualmente, diversos estudios han confirmado que el estatus mutacional de los genes IgVH, permite diferenciar dos subgrupos de pacientes con diferente heterogeneidad clínica y molecular en la LLC [13, 59, 61-65]. Además, cabe destacar que mientras la evolución cariotípica es una característica común durante el curso de la enfermedad [59, 65], el estatus mutacional de los genes IgVH permanece constante a lo largo del tiempo [59, 61]. A pesar del gran potencial de este factor pronóstico, se

enfrenta con el elevado coste que requiere el análisis, por tanto su disponibilidad es poco frecuente dentro de la práctica clínica.

1.3.3.2. Alteraciones citogenéticas

Las alteraciones citogenéticas se demuestran en cerca del 80% de los casos al diagnóstico y representan uno de los parámetros pronósticos más frecuentemente usados para la elección del tratamiento y evaluación de la supervivencia [66-67]. Se detectan mediante hibridación *in situ* de fluorescencia (FISH) como método estándar, por citogenética convencional y recientemente por *arrays* genómicos [68-71]. Las aberraciones recurrentes incluyen las deleciones 11q22-23, 17p13.1, 13q14 y la trisomía 12 [8, 68-70, 73]. Otras aberraciones estructurales con significado pronóstico son la presencia de traslocaciones no balanceadas y la complejidad genómica, aunque su presencia es relativamente baja en esta enfermedad [69, 72].

1.3.3.2.1. Deleción 13q14

La deleción 13q14 (deleción 13q), como anomalía genética aislada, es la alteración citogenética más común, con una frecuencia al diagnóstico superior al 50% de los casos [74-76]. Se ha asociado con un pronóstico favorable comparada a las deleciones 17p, 11q y a la trisomía 12 [68, 77, 78]. Varía marcadamente en su tamaño, desde alrededor de 300 Kpb a más de 700 Mpb [77, 79]. En la región mínima delecionada (MDR) de 13q14 se localizan varios genes entre los que están los genes *miR15a* y *miR16-1*, [80, 81]. Una de las funciones biológicas de estos genes es la regulación negativa del gen anti-apoptótico Bcl-2 a nivel post transcripcional, que está sobreexpresado en las células de LLC [80-82]. Se puede presentar de forma monoalélica (70%), bialélica (24%) o incluso como mosaicos (mono/bialélicas) [68, 83]. Las deleciones bialélicas podrían derivar de la evolución de clones monoalélicos (presentes normalmente en estadios tempranos de la LLC) y presentar un comportamiento clínico más agresivo [84, 85]. Sin embargo, otros estudios muestran que no hay diferencias significativas entre ambos tipos [86, 87]. Las deleciones de mayor tamaño se asocian con una menor SLT y SG comparada con pequeñas deleciones que solo abarcan los genes *miR15a* y *miR16-1* [89, 90-92]. Estudios recientes que integran el análisis

molecular y citogenético, confirman que los pacientes con esta delección como única alteración, representan un subgrupo de bajo riesgo [71, 93].

1.3.3.2.2. Trisomía 12

La trisomía 12 constituye una de las primeras aberraciones cromosómicas considerada como recurrente y con información pronóstica en la LLC [94, 95]. Esta anomalía se detecta en el 11-16% de pacientes al diagnóstico y se asocia con un bajo riesgo pronóstico [70, 74, 78, 96]. Clínicamente, la trisomía 12 de forma aislada, puede conferir una tasa de respuesta favorable ante tratamientos con quimio-inmunoterapia frente a la administración de quimioterapia convencional [97], probablemente, como consecuencia de una elevada expresión de CD20 y a la baja frecuencia de delección [98] o mutación del gen *TP53* en estos pacientes [99]. También se ha asociado con una morfología atípica de los linfocitos B [100], con la trisomía 19 [101], con mutaciones del gen *NOTCH1* [102, 103] y con la sobreexpresión de integrinas y moléculas de adhesión que pueden generar una mayor adhesión y motilidad celular [104, 105].

1.3.3.2.3. Delección 11q y mutación del gen *ATM*

La delección 11q22-q23 (delección 11q) es la segunda alteración citogenética más frecuente, después de la delección 17p13, asociada con pronóstico adverso [8, 106]. Se presenta entre un 10-15% de pacientes recién diagnosticados [67, 70], incrementándose entre un 20-25% de casos al primer tratamiento y al 25-30% en los casos refractarios a fludarabina [97, 107, 108]. Está asociada a genes IgVH-UM, inestabilidad genómica y a linfadenopatías voluminosas [109, 110]. De esta manera, pacientes de LLC con delección 11q se caracterizan por presentar una progresión temprana de la enfermedad, menor SLP después del tratamiento con quimioterapia estándar y reducción de la SG [70, 111-113]. Actualmente, el pronóstico de estos pacientes parece mejorar con la administración de inmunoterapia con anticuerpos anti-CD20, como Obinutuzumab (GA101) o Rituximab [97, 114].

La delección 11q puede ser superior a 20 megabases (Mb), mientras que la MDR abarca alrededor de 2 o 3 Mb [115]. Dentro de dicha región, se localiza el gen de

susceptibilidad a la ataxia telangiectasia (*ATM*). El gen *ATM* presenta 62 exones codificantes para una proteína kinasa que regula diferentes funciones en respuesta a la rotura del ADN de doble cadena, mediante la activación de múltiples dianas que sincronizan la reparación del ADN, la detención del ciclo celular en diferentes puntos de control y la inducción de la apoptosis si el daño celular no puede ser reparado [116, 117]. La proteína *ATM* puede activar a *p53* y también fosforilar a su regulador negativo *MDM2*, induciendo su degradación. Así, la activación de *p53* mediante *ATM*, detiene el ciclo celular en G1/S, o si el daño del ADN fuese severo, *p53* interviene en la expresión de diferentes proteínas proapoptóticas [118, 119].

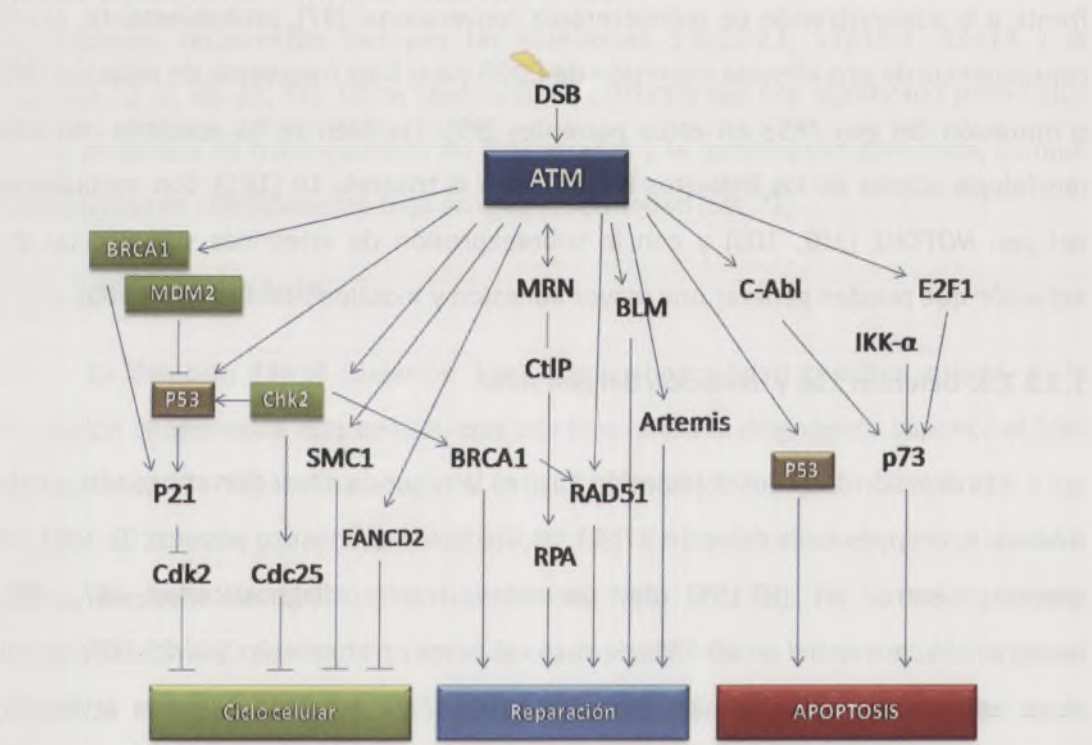


Figura 3: Esquema de las proteínas fosforiladas por ATM en respuesta al daño del ADN. La figura muestra las principales proteínas diana para ATM implicadas en la regulación del ciclo celular, reparación del ADN en respuesta a la rotura del ADN de doble cadena (DSB) y apoptosis. Modificado de [29].

Entre el 20-40% de los pacientes con delección 11q presentan mutaciones en el gen *ATM* del alelo restante, provocando la inactivación bialélica del gen [120, 121]. La pérdida funcional de este gen, puede producirse por la presencia de alteraciones bialélicas (mutación y delección) o a través del efecto dominante negativo de una única mutación [122, 123]. En células de LLC, la delecciones 11q son monoalélicas [124, 125]. Por otra parte, las mutaciones se localizan a lo largo de toda la secuencia codificante,

sin presentar una mayor concentración de mutaciones conocidas como regiones "hot-spots", lo que dificulta técnicamente el análisis mutacional del gen. Las mutaciones pueden ser adquiridas en diferentes estadios de la enfermedad (mutaciones somáticas) y en algunos casos pueden estar ya presentes en la línea germinal del paciente (mutaciones germinales) [120, 122].

Los pacientes con delección 11q pueden dividirse en dos subgrupos genéticos dependiendo del estado mutacional del alelo restante [122]. Así, un estudio reciente indica que pacientes en progresión con inactivación bialélica de *ATM* presentaron menor SLP y SG, cuando fueron tratados con agentes alquilantes y análogos de purina [121, 126]. Por otro lado, la inactivación bialélica del gen *ATM* no excede a un 40% de casos de pacientes con delección 11q [120, 121]. Lo que parece indicar que, además del gen *ATM*, la delección 11q puede afectar a más genes implicados en la respuesta al daño del ADN. De hecho, se ha propuesto que la haploinsuficiencia de otros genes, puede contribuir a la patogénesis y progresión clínica de los pacientes con esta delección [121, 122, 127, 128].

1.3.3.2.4. Delección 17p13 y mutaciones del gen TP53

Los pacientes con delección 17p13.1 (delección 17p) y/o mutación del gen *TP53* presentan el fenotipo más agresivo y son los únicos marcadores que actualmente son recomendados para dirigir la decisión de iniciar tratamiento una vez se inicia la progresión clínica [3, 73]. La delección 17p contiene el locus del gen *TP53*, un importante gen supresor tumoral conocido como el principal guardián de la integridad del genoma. La delección o inactivación mutacional de este gen, incrementa la susceptibilidad para desarrollar diferentes tipos de cáncer [129-132]. Los niveles de la proteína p53 pueden incrementarse por mecanismos post-transcripcionales en respuesta al daño del ADN celular, lo que conlleva el incremento de la transcripción de genes que promueven la detención del ciclo celular, para llevar a cabo la reparación de las lesiones del ADN antes de su replicación [131]. Por tanto, la inducción de p53 impide la perpetuación de mutaciones potencialmente dañinas. Sin embargo, si el daño del ADN es mayor, p53 induce la transcripción de genes proapoptóticos que

llevan a la muerte celular y a la eliminación de la célula dañada [133]. Además, a través de mecanismos no transcripcionales p53 también puede inducir apoptosis, en coordinación con la maquinaria apoptótica localizada en la membrana mitocondrial externa [134, 135] que conduce a la activación de proteínas proapoptóticas como Bax [136] y Bak [137], la liberación del citocromo C, la activación de caspasas y finalmente, la muerte celular [138, 139].

La delección 17p es detectada al diagnóstico con una frecuencia entre el 3-5% [70, 113]. Durante la progresión, se observa en el 8-11% de los casos durante el primer tratamiento, incrementándose hasta un 45% en pacientes en recaída y refractarios a fludarabina [97, 107, 108, 140-141]. La mayoría de agentes quimioterápicos usados en el tratamiento de la LLC, median la muerte celular a través del daño al ADN y de la apoptosis dependiente de p53 [142, 143]. Por tanto, la pérdida de la funcionalidad del gen *TP53* o de su activador principal en respuesta a la rotura del ADN de doble cadena, la proteína ATM, podrían explicar la resistencia al tratamiento observado en los pacientes con alteraciones en los genes *TP53* y *ATM*. Los pacientes con delección 17p, presentan asociación con genes IgVH-UM, alta expresión de ZAP70 [62, 144] y complejidad genómica [145, 146]. Alrededor del 80-90% de los casos con delección monoalélica de este gen, presentan mutación del otro alelo, por tanto, muy pocos casos con delección 17p presentan una vía funcional de p53 [64, 147]. Además, se conoce que la combinación de delección 17p y mutación del gen *TP53* se incrementa durante la progresión y se acumula en pacientes quimiorrefractarios [64, 108, 109, 147, 148]. De esta manera, las anormalidades del gen *TP53* representan el factor predictivo más importante de quimioresistencia y pronóstico adverso descrito en esta enfermedad [141, 149].

1.3.3.2.5. Complejidad genómica

Se define como un alto número de alteraciones genómicas, concretamente tres o más delecciones y/o ganancias [109, 150]. Estas aberraciones genómicas son poco frecuentes al diagnóstico pero pueden incrementarse durante el curso de la enfermedad y conducir a un cariotipo más complejo [150]. Se ha demostrado que la

complejidad genómica es un marcador de riesgo independiente asociado con una menor SG [110, 151]. Además, la presencia de cariotipo complejo en los pacientes se ha asociado significativamente a deleciones 11q y 17p [109, 146], probablemente debido a que la pérdida de mecanismos de reparación del ADN, hace que los pacientes de LLC pueden adquirir más fácilmente alteraciones adicionales.

1.3.3.3. Nuevas mutaciones genéticas

Las actuales técnicas de secuenciación masiva han permitido la identificación de mutaciones en genes recientemente implicados en la patogénesis de la LLC, como *BIRC3*, *SF3B1* y *NOTCH1*, cuyas alteraciones moleculares actualmente están en fase de estudio con el fin de evaluar su impacto pronóstico en la clínica de los pacientes [73].

1.3.3.3.1. Gen *BIRC3*

El gen *BIRC3* se localiza en la región 11q22.2 aproximadamente a 6 Mb del gen *ATM*. En su función como supresor tumoral, codifica uno de los componentes principales del complejo proteico que regula negativamente la kinasa *MAP3K14*, un activador crucial de la vía no canónica de la señalización de *NF-κB* [152-154]. Recientemente, se ha detectado que este gen está alterado por mutaciones, deleciones o una combinación de ambas [155]. Las mutaciones inactivantes son en su mayoría *frameshift* o cambios sin sentido, que conducen al truncamiento del dominio RING en la región c-terminal de la proteína. Este dominio es esencial para la adición de ubiquitinas y posterior degradación proteosómica de *MAP3K14*, contribuyendo a la activación de la señalización de *NF-κB*. Así, esta alteración puede proporcionar una explicación adicional a la activación constitutiva de esta vía, presente en las células de LLC y que se considera un mecanismo de resistencia en estas células tumorales [155-157]. Al diagnóstico, las mutaciones se detectan en cerca del 5% de los casos al diagnóstico y se incrementan hasta un 24% en pacientes refractarios a fludarabina [126, 155, 158]. Las alteraciones del gen *BIRC3* (deleción y/o mutación) ocurren de manera excluyente con las alteraciones del gen *TP53*, se asocian con un estadio más agresivo y con una menor supervivencia independiente de la deleción 11q [73]. Se han asociado con quimiorrefractoriedad en pacientes que no presentan alteraciones del gen

TP53 [73, 126, 159]. Se conoce que la refractariedad a fludarabina se debe a alteraciones del gen *TP53* que ocurren en un 40% de los casos. El restante 60% de pacientes de alto riesgo, carece de alteraciones en *TP53* [108, 146] y por tanto, se investiga si las alteraciones del gen *BIRC3*, podrían explicar esta quimioresistencia [155].

1.3.3.3.2. Gen *SF3B1*

Codifica una proteína que es componente principal del centro catalítico del espliceosoma (*U2 snRNP*), complejo formado por ribonucleoproteínas de pequeño tamaño (*snRNPs*), que permite la formación de ARNm maduro a través de *splicing* alternativo del ARNm precursor. Concretamente, *SF3B1* actúa en las fases iniciales del *splicing* del ARN, donde se cree probablemente se una al pre-ARNm para permitir que *U2 snRNP* pueda unirse al ARN [160-162].

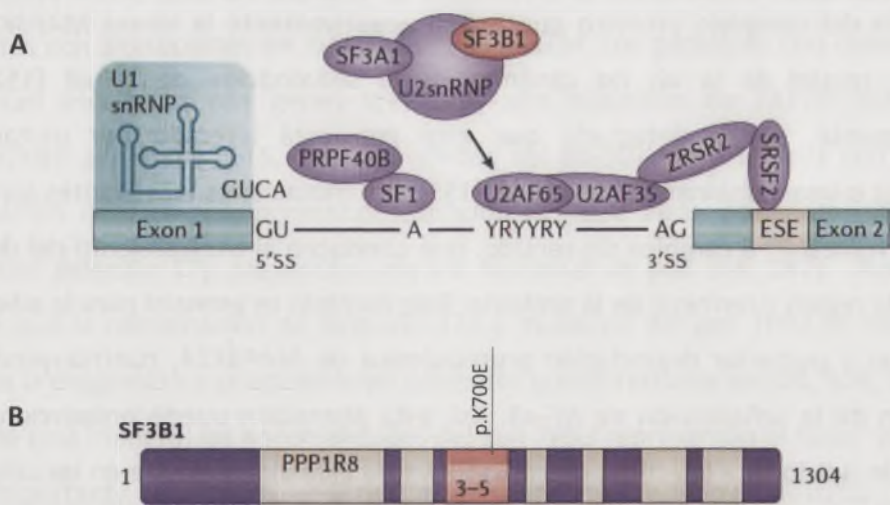


Figura 4: Mutaciones y vía de señalización de *SF3B1* en LLC. A. Esquema de la interacción de *SF3B1* en el complejo del espliceosoma, B. Esquema de la proteína *SF3B1* y sus dominios funcionales, con la localización de la mutación somática más frecuente (p.K700E). Modificado de [29].

Las mutaciones de *SF3B1* se detectan en el 4-7% de los pacientes al diagnóstico, entre el 7-17% al primer tratamiento y en pacientes quimiorrefractarios [163, 164]. La mayoría de estas mutaciones son *missense*, afectan los dominios HEAT de la proteína y

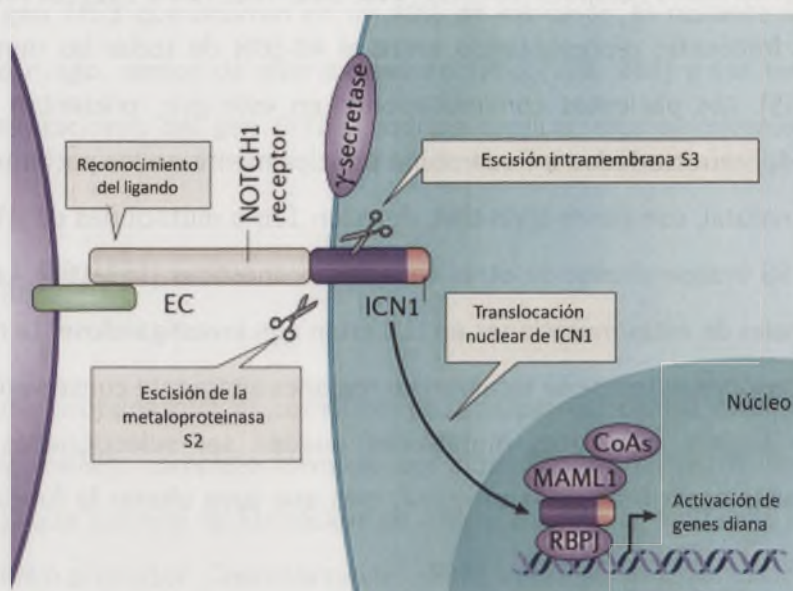
recurrentemente afectan a cinco codones con una elevada frecuencia de mutaciones, también llamados *hotspots* (codones 662, 666, 700, 704 y 742). La mutación K700E es la más frecuente, representando entre el 40-50% de todas las mutaciones del gen (163-165). Los pacientes con mutaciones en este gen, presentan un estadio más avanzado, refractariedad a fludarabina principalmente en los pacientes con *TP53 wild type* o natural, con genes IgVH-UM, delección 11q o mutaciones de *ATM*, y con menor SLT y SG independiente de otras variables pronósticas [163-166]. Las consecuencias funcionales de estas mutaciones en LLC están aún investigándose. La mayor frecuencia de mutaciones *missense* se localizan en regiones altamente conservadas de la proteína, lo que sugiere que estas mutaciones pueden ser seleccionadas para modificar actividades específicas de la proteína, más que para alterar la función general [164-167].

1.3.3.3.4. Gen NOTCH1

El gen *NOTCH1* codifica una proteína transmembrana heterodimérica de clase I. Esta proteína actúa como un factor transcripcional activado por ligando, que determina un papel esencial en la diferenciación celular, proliferación y apoptosis tanto en el desarrollo embrionario como en el tejido adulto [168-172].

Durante la hematopoyesis está implicado en la regulación de diferentes funciones del sistema hematopoyético, favoreciendo la diferenciación del linaje de células T en el adulto [173], y en linfocitos B maduros la señalización de *NOTCH1* activa la diferenciación terminal a células secretoras de anticuerpos [174]. La unión del receptor NOTCH1 con su ligando a través de su subunidad extracelular (EC), conduce a sucesivas escisiones proteolíticas del receptor, como los cortes producidos por S2 en el dominio transmembrana o S3 que escinde en el dominio intramembrana e interviene el complejo γ -secretasa [175, 176]. Esto permite la liberación de la porción intracelular del receptor al núcleo (ICN1), donde NOTCH1 se une a diferentes proteínas como RBPJ y a proteínas co-activadoras como co-A, incluyendo MAML1, para inducir la activación transcripcional de múltiples genes diana, incluyendo MYC, TP53 y moléculas de la ruta NF- κ B implicadas en la patogénesis de esta leucemia [176] (Figura 4)

A



B

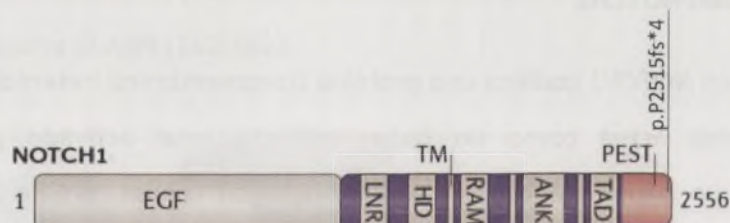


Figura 5: Mutaciones y vía de señalización de NOTCH1 en LLC. A. Inicio de la señalización y procesamiento de la vía NOTCH1, B. Esquema de la proteína NOTCH1 y sus respectivos dominios, con la localización de la mutación más frecuente (p.P2515fs*4). Modificado de [29].

Las mutaciones del gen *NOTCH1* fueron recientemente identificadas por primera vez en la LLC por dos grupos independientes [177, 178]. Son significativamente más frecuentes en pacientes con IgVH-UM y con trisomía 12, e identifican un subgrupo clínico de pacientes que presentan una menor SG [102, 103, 159, 163, 164, 177, 179]. La mayoría de las mutaciones son *frameshift* y se agrupan dentro del exón 34, incluyendo una delección altamente recurrente c.7544_7545delCT (p.P2515fs*4), que abarca entre el 80-90% de las mutaciones de este gen y afecta al dominio C-terminal PEST del gen [159, 177, 180]. Este dominio (secuencia rica en prolina, ácido glutámico, serina y treonina) se describe como clave en la limitación de la intensidad y la duración de la activación en la señalización de NOTCH1 [180]. Su inactivación altera la degradación y acumulación de la isoforma activa de NOTCH1,

desregulando su señalización [178, 179]. Las alteraciones de este gen se detectan en un 10% de los pacientes al diagnóstico, entre un 20-25% durante el primer tratamiento y si son quimiorrefractarios entre un 25-30% [159, 181]. Además, un 40-50% de pacientes con mutaciones NOTCH1 presentan riesgo de desarrollar síndrome de Richter [159, 177, 178].

1.4. Regulación de la apoptosis en la LLC

Tradicionalmente, esta leucemia fue considerada como una enfermedad de origen celular homogéneo causada por la acumulación de células B inmaduras debido principalmente a un deficiente proceso de muerte celular por apoptosis y a un bajo índice proliferativo. Sin embargo, en los últimos años este concepto ha cambiado. Las investigaciones muestran que se origina a partir de linfocitos B maduros, cuya supervivencia y expansión no sólo se producen como consecuencia de fallos durante la apoptosis, sino que también intervienen señales de supervivencia del microambiente celular que desempeñan una función relevante [1].

Por otra parte, aunque la mayor parte de las células de LLC se encuentran en fase G0, se ha descrito la proliferación activa de una pequeña fracción de células tumorales en los órganos linfoides, que generan alrededor del 2% de los linfocitos leucémicos cada día [24].

1.4.1. Apoptosis y vías de señalización

La muerte celular programada, conocida como apoptosis, está caracterizada por una serie de eventos bioquímicos que conducen a la activación de proteasas intracelulares denominadas caspasas. Después de la activación de las caspasas, se producen diferentes cambios estructurales en la célula entre los que se incluyen la pérdida de la asimetría de la membrana plasmática, la fragmentación nuclear, la condensación de la cromatina y finalmente la muerte celular [182, 183]. La mayoría de estos cambios físicos son observados en condiciones *in vitro*, ya que *in vivo*, las células que experimentan apoptosis son rápidamente fagocitadas, como consecuencia del reconocimiento de residuos de fosfatidilserina en la cara externa de la membrana

plasmática [184]. En la última década, el estudio de este proceso se ha vuelto crucial en diferentes tipos de cáncer, debido a que la mayoría de cánceres humanos son intrínsecamente resistentes a la apoptosis, o bien, pueden adquirir resistencia después del tratamiento.

Existen dos vías diferentes que inducen apoptosis, la vía intrínseca y la extrínseca, dependiendo si la señal de muerte es intracelular o no, respectivamente. La vía extrínseca, se origina por la intervención de receptores de muerte en la superficie celular [186]. La unión de estos receptores extracelulares de la superfamilia TNF al ligando, recluta determinadas proteínas que conducen a la activación de la caspasa-8, que posteriormente activa a las caspasa-3 y caspasa-7 [187] (Figura 5).

La vía intrínseca o mitocondrial, se regula mediante proteínas de la familia Bcl-2 y se activa por diferentes estímulos citotóxicos como estrés celular o agentes quimioterapéuticos, entre otros factores [185]. Este proceso da lugar a la liberación de diferentes proteínas de la familia Bcl-2 que controlan la permeabilización de la membrana mitocondrial externa (MME) y por tanto la salida del citocromo c [185]. En primer lugar, se activan las proteínas Bcl-2 que sólo tienen homología BH3 (Iniciadoras), las cuáles inhiben a las proteínas Bcl-2 pro-supervivencia (Guardianas), que permiten la activación de los efectores pro-apoptóticos Bax y Bak y que finalmente alteran la MME, liberando el citocromo c mitocondrial. Ya en el citoplasma, se une a la proteína adaptadora Apaf-1 y a una caspasa iniciadora denominada procaspasa-9, formando el llamado apoptosoma. Todo esto da lugar a la activación de la caspasa-9, que desencadena la activación de las caspasas -3 y -7. De esta manera, en ambos procesos de muerte celular intrínseca como extrínseca, se produce la activación de caspasas, que finalmente producen los cambios biológicos asociados a la muerte de la célula [188].

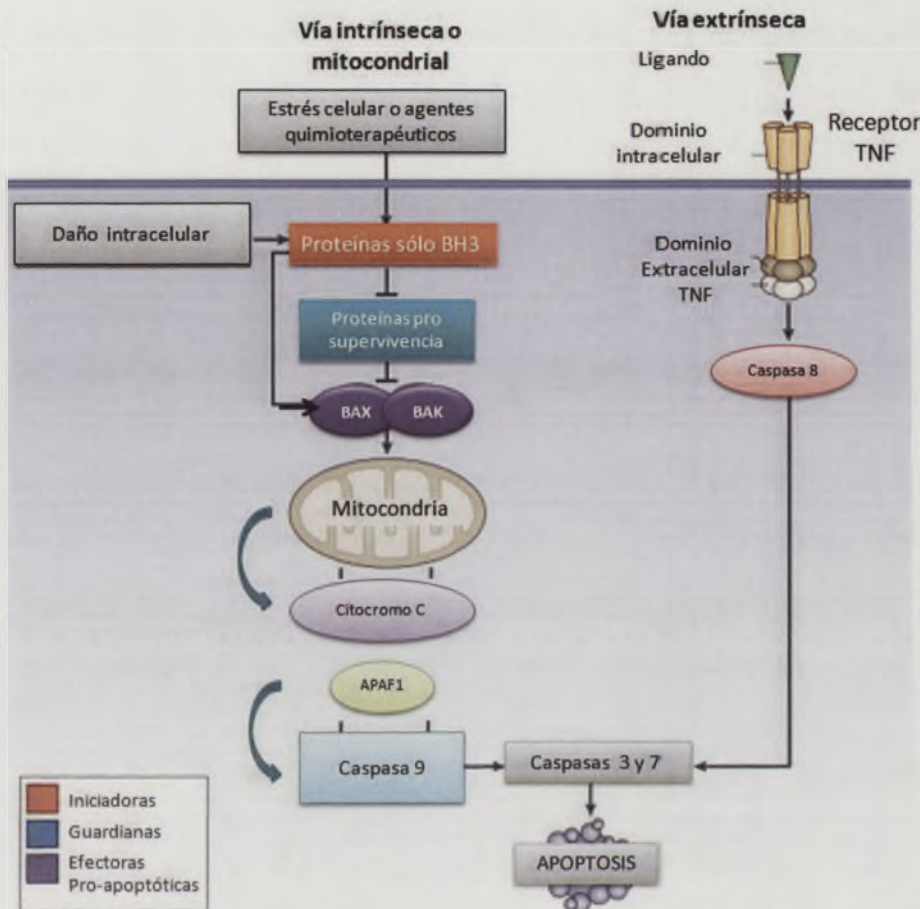


Figura 6: Vías de inducción de apoptosis de tipo intrínseca y extrínseca. Modificado de [200].

1.4.2. Proteínas de la familia Bcl-2

Las proteínas de la familia Bcl-2 son reguladores clave del proceso de apoptosis. Estas proteínas han sido asociadas a la patología de la LLC, siendo la sobreexpresión de las proteínas Bcl-2 anti-apoptóticas, una característica crucial en esta leucemia [189-191]. El perfil de expresión de diferentes proteínas de esta familia se ha asociado con un pronóstico adverso [192, 193] y con quimiorrefractoriedad [194-196]. Se conocen tres subfamilias basadas en el número de dominios de homología Bcl-2 (BH) que presentan y en su funcionalidad pro o anti-apoptótica [197]. Las proteínas anti-apoptóticas Bcl-2, Bcl-XL, Bcl-W, Mcl-1, Bfl-1 y Bcl-B presentan cuatro dominios de homología BH (BH1- BH4) e interactúan con otras proteínas de la familia Bcl-2 para impedir la permeabilización de la membrana externa mitocondrial. Por otra parte, las

proteínas pro-apoptóticas están divididas en dos subgrupos: el primero incluye las proteínas Bax, Bak y Bok, que se conocen como proteínas multidominio porque contienen cuatro dominios BH (BH1-BH4), mientras que el segundo grupo incluye a Bim, Bid, Bad, Noxa, Puma, Hrk y Bmf, que presentan sólo el dominio de homología BH3 [198] (Figura 6). Ante un estímulo citotóxico, se activan las proteínas que sólo presentan dominio BH3, llamadas proteínas iniciadoras o activadoras porque transmiten las señales para iniciar la apoptosis e inhibir a las proteínas Bcl-2 anti-apoptóticas. Estas proteínas son consideradas guardianes celulares pro-supervivencia por ser capaces de inhibir a Bax y Bak, llamados ejecutores, ya que al activarse forman oligómeros y permeabilizan la membrana mitocondrial externa [199].

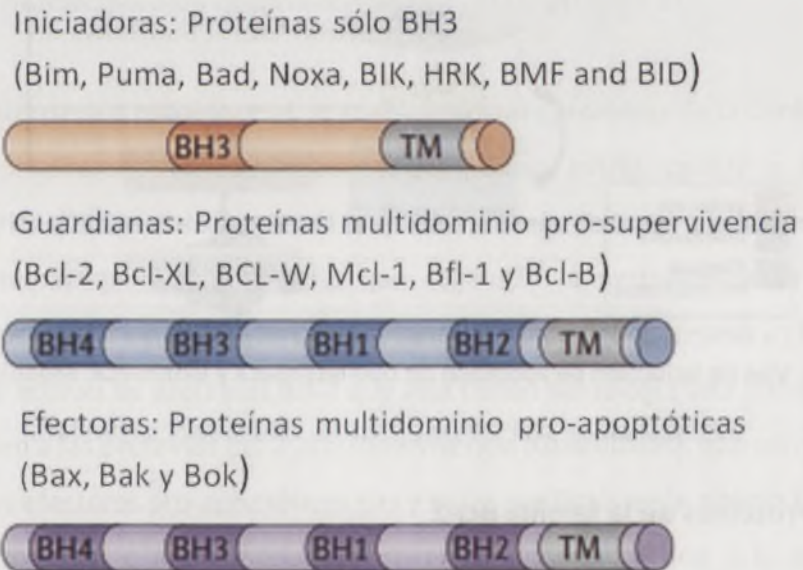


Figura 7: Estructura de las proteínas de la familia Bcl-2 según los dominios de homología. Modificado de [200].

La proporción entre los miembros pro-apoptóticos y anti-apoptóticos de la familia Bcl-2 puede inclinar la balanza hacia la muerte celular mediada por caspasas o hacia la supervivencia celular. Se han propuesto varios modelos sobre cómo las interacciones de estas proteínas determinan si una célula se somete o no a apoptosis. En el modelo indirecto, se ha propuesto que Bax y Bak siempre deben estar unidos a proteínas anti-apoptóticas para prevenir su activación. Para que Bax y Bak puedan permeabilizar la membrana mitocondrial externa tienen que estar libres, lo que se

consigue si todas las proteínas pro-supervivencia se neutralizan por las proteínas de dominio BH3 [200].

En contraste, el modelo de activación directo propone que un subgrupo de proteínas pro-apoptóticas sólo-BH3 activadoras, que incluyen la forma truncada de Bim (tBid), Bim y Puma, pueden interactuar y activar directamente a los efectores Bax y Bak. Este modelo, clasifica a las proteínas BH3 en activadoras o sensibilizadoras. Las sensibilizadoras no pueden activar directamente a Bax y Bak y en su lugar secuestran o bloquean las proteínas anti-apoptóticas, permitiendo de este modo la activación de Bax y Bak [201]. El modelo actual muestra que tanto el modelo de activación directa como el indirecto son aplicados en diferentes circunstancias. Así, este modelo unificado, requiere que las proteínas anti-apoptóticas secuestren no sólo a las proteínas con sólo dominio BH3, sino que también activen a Bax y Bak [202].

De esta manera, para que una célula sufra apoptosis, las proteínas pro-apoptóticas deben competir para unirse a las diferentes proteínas anti-apoptóticas y establecer una correcta combinación [203, 204]. Con estos modelos, se observa que las proteínas Bcl-2 presentan una unión selectiva entre ellas. De forma general, algunas proteínas iniciadoras que presentan sólo el dominio BH3, pueden neutralizar a todas las proteínas pro-supervivencia, mientras que otras como Bad y Noxa, pueden unirse de forma selectiva sólo a un grupo limitado. Por otra parte, Bax es predominantemente inhibido por Bcl-XL, Mcl-1 y A1, mientras que Bak, probablemente pueda ser inhibido por todas las proteínas pro-supervivencia (Figura 7).



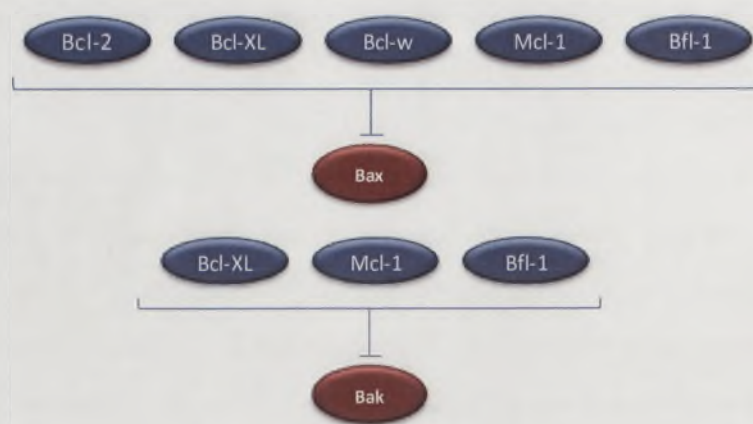


Figura 8: Esquema representativo de la unión selectiva e interacción entre las proteínas Bcl-2 más destacadas del grupo de iniciadoras, pro-supervivencia y pro-apoptóticas.

1.4.3. Expresión de la familia Bcl-2 en la resistencia a fármacos en LLC

Los miembros de la familia Bcl-2 presentan una importante función en la resistencia a fármacos. En la LLC, muchos de los miembros anti-apoptóticos de la familia Bcl-2 están sobre expresados, dando lugar a la inhibición de las proteínas anti-apoptóticas. [205]. Entre ellos, la elevada expresión de la proteína Bcl-2 se ha considerado un factor pronóstico independiente [193], asociándose a una menor SG en pacientes tratados previamente, e incrementándose su expresión en pacientes refractarios a fludarabina [190, 194]. Además, se ha observado que en la resistencia *in vivo* a Clorambucilo [196], Fludarabina, Doxorrubicina y Etopósido [206], los pacientes con una elevada proporción de Bcl-2/Bax, fueron más resistentes al tratamiento. Además, los niveles de Bcl-2, Mcl-1, Bcl-w y Bfl-1, disminuyen cuando las células leucémicas sufren apoptosis espontánea en cultivo, indicando que los niveles de estas proteínas participan en la supervivencia de estas células [205].

Por otra parte, la proteína anti-apoptótica Mcl-1, ha sido implicada en la regulación de la apoptosis, representando una importante diana terapéutica en esta leucemia. Altos niveles de Mcl-1 se han asociado a quimioresistencia y a un pronóstico adverso, como consecuencia de la incapacidad de lograr una respuesta completa frente a diferentes agentes quimioterápicos como Clorambucilo, Fludarabina y Rituximab en condiciones *in vitro* e *in vivo* [207, 208]. La disminución de la expresión de Mcl-1, activa la apoptosis en diferentes modelos tumorales de células B [209-211],

así como en la LLC [212-214]. Mcl-1 presenta una estricta regulación en cuanto a su recambio proteico (presenta una vida media inferior a 30 minutos) y puede ser degradada por la adición de ubiquitina [215]. Además, los niveles de expresión de Mcl-1 aumentan mediante la señalización de Akt y ERK en células tumorales [216, 217].

Se sabe que tanto Mcl-1 como otros miembros de la familia Bcl-2, están sujetos a diferentes modificaciones transcripcionales y traduccionales [199]. La proteína p53 puede regular proteínas de la familia Bcl-2 a nivel transcripcional y post-transcripcional. Proteínas pro-apoptóticas como Bax, Puma, Noxa y Bid son dianas transcripcionales directas de p53, por tanto, la pérdida de funcionalidad de p53 puede conducir a una expresión defectuosa de estas proteínas [218, 219]. El tratamiento con fludarabina induce la expresión de Bax y Puma de manera p53 dependiente, y en células tumorales deficientes de p53 no se detecta la expresión de Puma, mostrando la importante función de p53 en la regulación de proteínas Bcl-2 en respuesta a agentes quimioterápicos [220].

1.5. Microambiente celular de la LLC

El microambiente en la LLC se caracteriza por la formación de diferentes poblaciones de células no neoplásicas, denominadas células estromales, y otros componentes del medio extracelular como vasos sanguíneos o factores solubles. Todos estos tipos celulares conforman un andamiaje funcional en interacción con las células tumorales, que emprende el crecimiento tumoral y la resistencia a diferentes fármacos [221-223]. El pequeño porcentaje de células leucémicas que se mantienen en división, se genera en estructuras microanatómicas denominadas centros de proliferación, que se localizan en la médula ósea y en tejidos linfoides secundarios como los ganglios linfáticos y el bazo, representando una histopatología característica en esta leucemia [224, 225].

La proliferación celular es favorecida por la alta dependencia existente entre las células tumorales y las señales externas del microambiente, tales como antígenos, citoquinas e interacciones célula-célula. Una evidencia de esta dependencia se

muestra cuando las células de LLC de sangre periférica, caracterizadas por su resistencia *in vivo*, experimentan apoptosis espontánea en condiciones que apoyan el crecimiento *in vitro* de líneas celulares de linfocitos B [226-227]. Sin embargo, este proceso no ocurre cuando son co-cultivadas con determinadas células estromales del microambiente celular, lo que implica que tales condiciones *ex vivo* carecen de factores de supervivencia esenciales. Estos datos apoyan que la resistencia a la apoptosis depende de señales externas, en lugar de ser una característica intrínseca de las células leucémicas.

Por tanto, para una supervivencia prolongada *in vivo* de estas células, es determinante una coexistencia regulada con estímulos externos que reciben del microambiente [228-230]. Sobre la base de este concepto, se están investigando tratamientos más eficientes y dirigidos hacia la elevada dependencia entre las células tumorales y el microambiente celular [231-232].

1.5.1. Microambientes especializados

La médula ósea y los órganos linfoides secundarios, están finamente coordinados durante el proceso de maduración y diferenciación de los linfocitos B (ver apartado de ontogenia del linfocito B). Del mismo modo, para el desarrollo de la leucemia, conforman dos microambientes especializados y totalmente diferenciados, para la interacción con las células tumorales. Ambas estructuras están constituidas por diferentes factores de crecimiento, citoquinas y proteínas de la matriz extracelular [223, 225]. Todo ello permite una evolución dinámica entre las células leucémicas y las células no tumorales, donde las células tumorales no juegan un papel pasivo, sino que activamente crean condiciones para tener un microambiente favorable para su expansión. Por otra parte, la circulación de sangre periférica anteriormente se había considerado sólo un compartimento transitorio para las células de LLC [230, 233-234]. Sin embargo, recientemente se ha demostrado que la interacción con el endotelio vascular también proporciona señales de supervivencia al clon leucémico, secretando factores pro-angiogénicos como VEGF, mediante interacciones mediadas por CD31 expresado en células endoteliales, entre otras interacciones [235-236].

1.5.1.1. Microambiente de la médula ósea

El microambiente de la médula ósea está compuesto principalmente por células estromales mesenquimales (MSCs) dispersas por toda la cavidad medular, que mantienen a las células madre hematopoyéticas (HSCs) dentro de nichos especializados cercanos a la vasculatura medular (nicho vascular) o al endostio (nicho osteoblástico) [237]. Además, presentan una gran influencia en el desarrollo y progresión de diferentes tipos de cáncer [238]. Concretamente en la LLC, estas células son vitales por las señales de supervivencia y resistencia a fármacos que emiten hacia las células leucémicas [239, 240].

1.5.1.2. Microambiente de los órganos linfoides secundarios

Los linfocitos B maduros migran desde la médula ósea hacia los órganos linfoides secundarios donde serán expuestos a antígenos en los CGs, cuyo microambiente permite la maduración de los linfocitos B al interactuar con linfocitos T CD4+ y con células dendríticas foliculares (FDCs) [241, 242]. Además, presenta células nodriza de linaje mieloide (NLCs) que participan en la activación de rutas de señalización del BCR, debido a que en el microambiente de los órganos linfoides secundarios se produce la activación de su receptor. Por tanto, las interacciones entre las células de LLC y este microambiente, son críticas para proporcionar señales de crecimiento y supervivencia tumoral [225].

1.5.2. Células del microambiente celular

1.5.2.1. Células estromales mesenquimales (MSCs)

Las MSCs además de estar presentes fundamentalmente en la médula ósea (BMSCs), también forman parte del microambiente de los tejidos linfoides secundarios [243]. En condiciones *in vitro*, las células de LLC presentan alta afinidad por las células BMSCs [244]. Se produce una rápida migración espontánea de las células tumorales hacia las células estromales y durante esta interacción celular, es esencial el contacto célula-célula, pudiendo incluso emitir proyecciones de membrana sin llegar a internalizar a las células leucémicas [244, 245]. Diferentes estudios muestran que los

cocultivos con BMSCs, protegen a las células leucémicas de la apoptosis, tanto espontánea como inducida por fármacos [230,246, 247].

De esta forma, los ensayos realizados con líneas celulares de BMSCs, se han estandarizado, representando actualmente una herramienta útil en el estudio de las diferentes señales de supervivencia y resistencia a fármacos [248]. Las BMSC expresan diferentes factores solubles, predominantemente la quimioquina CXCL12 [249], que permite a las células de LLC circulantes en sangre periférica ser atraídas hacia la médula ósea, a través de la interacción con sus receptores CXCR4 y CXCR5, expresados en niveles altos en las células tumorales [244, 246]. Además, producen un efecto de pro-supervivencia [228, 250], mediante la activación de las vías p44/42 MAP quinasa-(ERK1/2) y STAT3 [224, 228, 251].

En la adhesión celular con las MSCs, colaboran diferentes moléculas expresadas en las células leucémicas, en particular las integrinas $\alpha 4\beta 1$ (VLA-4), que interaccionan con su ligando VCAM-1, expresado en niveles altos en las MSCs [252, 253]. Se conoce que las integrinas VLA-4 cooperan con los receptores de quimioquinas en la adhesión celular entre las células de LLC y las MSCs [244, 254], y la unión a su ligando VCAM-1 protege de la apoptosis espontánea a las células tumorales mediante la activación de la vía PI3K/Akt, crucial en la supervivencia de éstas [252, 253]. Por otra parte, la interacción con la metaloproteinasa de matriz-9 (MMP-9), altamente expresada en las células de LLC de la médula ósea [256, 257], así como la interacción de la integrina $\alpha \beta_2$ y su ligando ICAM-1, expresado en células estromales, también cooperan en la adhesión de las células de LLC con las MSCs [230]. Todos estos estudios indican que las MSCs destacan en el desarrollo de la leucemia, a través del contacto directo o por la secreción de factores soluble. No sólo atrayendo a las células tumorales hacia nichos específicos del microambiente, sino que además, regulan su supervivencia y expansión.

1.5.2.2. Células nodriza de linaje mieloide (NLCs)

Las NLCs se localizan en el bazo y en tejidos linfoides [258, 259] y atraen a las células de LLC a los órganos linfoides secundarios por la secreción de CXCL12 y CXCL13.

Protegen a las células tumorales de la apoptosis (espontánea e inducida por fármacos) a través de la expresión de CXCL12 [260, 261] o por la expresión de miembros de la familia TNF denominados BAFF y APRIL [261], así como por la expresión de CD31. CD38 al expresarse en células tumorales puede unirse a CD31, activando ZAP-70 y con ello, otras rutas de supervivencia celular. En condiciones *in vitro*, las NLCs se diferencian a partir de monocitos cuando son cocultivadas con células de LLC en alta densidad durante 7 a 14 días [260]. Además, proveen diferentes señales que promueven el crecimiento de las células leucémicas y están implicadas en la estimulación del BCR en estos tejidos [262]. La estimulación del BCR o el co-cultivo con células NLCs, induce en las células tumorales la secreción de CCL22 [263], CCL3 y CCL4 [262, 264], potentes quimioquinas que atraen a otras células del estroma, como las células T CD4+.

1.5.2.3. Las células T

Las células T CD4+ interactúan con las células B maduras en el microambiente de los CGs, para favorecer la interacción con otras células estromales como las FDCs. La composición celular de los centros de proliferación incluye numerosas células T CD4+ [263, 265], que se unen a células tumorales CD40+ para ser rescatadas de la apoptosis [266]. Las células T pueden estimular el crecimiento y supervivencia de las células leucémicas mediante la secreción de citoquinas, tales como interleucina 4 (IL-4) o TNF-alfa, considerados importantes reguladores de la supervivencia tumoral [266].

1.5.2.4. Células dendríticas foliculares (FDCs)

Las FDCs, junto con las NLCs, secretan CXCL13, una potente quimioquina que atrae a las células de LLC y que es clave en el establecimiento de la arquitectura de los folículos del CG [258]. Además, junto con las células T CD4+ cooperan en la maduración de los linfocitos B [267, 268].

1.6. Angiogénesis en la LLC

La angiogénesis es un proceso fisiológico que implica el desarrollo y crecimiento de nuevos vasos sanguíneos a partir de los ya existentes, a diferencia de la vasculogénesis, que hace referencia a la formación *de novo* de los mismos [269]. Es un proceso fundamental en el desarrollo, invasión tumoral y formación de metástasis

[270]. Los componentes celulares y moleculares que conforman el microambiente de la médula ósea presentan un equilibrio balanceado angiogénicamente, que es dependiente de una eficiente comunicación molecular entre diferentes factores pro y anti-angiogénicos, citoquinas, quimioquinas entre otros componentes celulares [271]. Y la alteración de este equilibrio angiogénico por la sobreexpresión de factores pro-angiogénicos, contribuye a la acumulación, proliferación y resistencia apoptótica de las células tumorales [271-273].

1.6.1. Familia VEGF

Uno de los principales factores pro-angiogénicos estudiados en la LLC que interviene en la formación de diferentes neoplasias hematológicas, es el factor de crecimiento vascular endotelial (VEGF) [272-274]. La familia VEGF está compuesta por siete glicoproteínas secretadas: VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGF-F y el factor de crecimiento placentario (PIGF), que estimulan la vasculogénesis y la angiogénesis mediante la unión a sus respectivos receptores. La vía molecular en la que interviene VEGFA, también conocido como VEGF, es muy activa en las células de LLC, siendo el miembro más estudiado y caracterizado de esta familia [269].

1.6.2. Estructura y expresión del gen VEGFA

El gen *VEGFA* está localizado en la región cromosómica 6p1.2 con una región codificante aproximada de 14Kb. Este gen está formado por ocho exones y siete intrones, a partir de los cuáles se generan diferentes isoformas por *splicing* alternativo [275]. Es altamente polimórfico, presentando polimorfismos de nucleótido único (SNPs) en las regiones codificantes que pueden influenciar su expresión [276], o en regiones 3' y 5' UTR, que contienen elementos reguladores sensibles a hipoxia que pueden contribuir a aumentar la variabilidad de la producción de VEGFA en diferentes tejidos [277].

La proteína VEGFA nativa es una glicoproteína de 45kDa, básica, homodimérica con varios puentes disulfuro intra e intercatenarios [278]. Durante la embriogénesis, VEGFA se expresa ampliamente detectándose en diferentes órganos [279]. Mientras

que en la etapa adulta, en condiciones normales, la expresión de VEGFA es baja o casi inexistente en la mayoría de los tejidos y está limitada a órganos que presentan capilares con endotelio fenestrado. Sin embargo, su expresión puede activarse por diferentes factores en determinadas condiciones fisiológicas, como en la creación de nuevos vasos sanguíneos después de una lesión o en condiciones patológicas [275, 277]. En respuesta a hipoxia, la expresión de VEGFA también puede activarse para mejorar el aporte de oxígeno a determinadas zonas titulares. Así mismo, su expresión tanto a nivel de proteína como de ARNm, puede variar por el efecto de diferentes factores de crecimiento, hormonas, citoquinas y otros componentes celulares [280].

1.6.3. Receptores de VEGFA

Se han identificado tres tipos de receptores de los factores de crecimiento vascular endotelial (VEGFRs) tirosin quinasa: VEGFR1, VEGFR2, VEGFR3 y las proteínas transmembrana sin actividad tirosin quinasa denominadas neuropilinas (NP-1 y NP-2). Tanto los receptores tirosin quinasa como el receptor NP-1 se expresan en las células de LLC [271, 274]. Los receptores VEGFR 1-3, son receptores alternos de VEGFA con importantes funciones en la vasculogénesis y el desarrollo celular hematopoyético. Sin embargo, la mayoría de estudios muestran que VEGFR2 es el receptor crítico en la transmisión de la señalización celular y en la proliferación y diferenciación de las células endoteliales, mientras que VEGFR1 puede ser más importante en la remodelación vascular y en la migración de monocitos [274]. La expresión de VEGFR2, a diferencia de VEGFR1, ha sido significativamente mayor en pacientes con estadios avanzados, así como también, se han determinado elevados niveles de este receptor, asociados a factores adversos [281].

1.6.4. Funciones de VEGFA en la LLC

La mayoría de las acciones biológicas de VEGFA, entre ellas su función pro-angiogénica, se desencadenan por la unión a VEGFR2, expresado predominantemente en células endoteliales [282]. VEGFA actúa como una citoquina multifuncional que ejerce la mayor parte de sus funciones en el endotelio vascular. Entre estas funciones se encuentra favorecer la angiogénesis, promover la permeabilidad vascular y actuar

como vasodilatador [283]. El incremento de la expresión de VEGFA, tanto en la circulación como en el tejido tumoral, se ha asociado a un pronóstico desfavorable en diferentes tipos de cáncer, incluyendo la LLC [284].

1.6.4.1 Función pro-angiogénica

El incremento de la densidad de los vasos sanguíneos en la médula ósea y en los nódulos linfáticos de los pacientes, fue una de las primeras evidencias que mostraba la importancia de la angiogénesis en esta enfermedad [274, 285, 286]. Este incremento se produce como resultado de una angiogénesis dependiente de VEGFA asociada a estadios avanzados [272, 286- 287]. A pesar de que los niveles de expresión varían considerablemente entre los pacientes, el aumento de su expresión tanto en suero como en plasma, se correlaciona con progresión de la enfermedad [281, 288]. Ensayos de angiogénesis *in vivo* demostraron que la expresión de VEGFA proveniente de las células de LLC, fue capaz de inducir angiogénesis por la proliferación de las células endoteliales [282]. Resultados similares fueron obtenidos en experimentos *in vitro*, donde a partir del sobrenadante de células de LLC en condiciones de hipoxia, indicando que la expresión de VEGFA juega un papel fundamental como inductor de la angiogénesis asociada a LLC [287].

1.6.4.2. Función pro-supervivencia

VEGFA se ha descrito como factor de supervivencia para distintos tipos celulares, asociado al aumento de la expresión de la proteína anti-apoptótica Bcl-2 [289]. Sin embargo, aunque existen elevados niveles de Bcl-2 en LLC, hasta el momento no se ha descrito una asociación significativa entre Bcl-2 y VEGFA [290]. Además, VEGFR-2 parece ser el principal receptor de la familia VEGFR implicado en la supervivencia celular [284]. Por otra parte, se ha descrito que en la resistencia a la apoptosis de las células de LLC, intervienen mecanismos de supervivencia autocrinos y paracrinos dependientes de VEGFA [276, 291-294]. Entre los mecanismos autocrinos, los receptores VEGFR1 y VEGFR2 están constitutivamente fosforilados, pudiendo ser bloqueada esta fosforilación a través de anticuerpos contra VEGF [295]. Además, también se ha descrito que la administración de VEGF exógeno conduce a un efecto

pro-supervivencia, mediante la reducción de la apoptosis (espontánea e inducida por fármacos) a través del aumento de expresión de las proteínas anti-apoptóticas Mcl-1 y XIAP [294-295]. En cuanto a la vía paracrina dependiente de VEGF, un estudio reciente resalta que la proteína VEGFA procedente de las BMSCs, fue esencial en la resistencia apoptótica *in vitro* de las células tumorales [295].

1.6.4.3. Función en la regulación de la motilidad celular

La motilidad de las células de LLC, en el endotelio y a través del mismo, es un proceso decisivo en la invasión de los tejidos linfoides durante la progresión [296], interviniendo la integrina $\alpha 4\beta 1$ y la expresión autocrina de VEGF. La expresión constitutiva de VEGF también es necesaria para la migración celular regulada por MMP-9, ya que la interacción entre VEGFA y su receptor VEGFR2, disminuye la expresión de MMP-9 mediante la activación de STAT-1 [297]. Estudios con ensayos *in vitro* muestran que esta interacción lleva a la inhibición de la migración celular, lo que finalmente contribuye a la acumulación de las células tumorales y a la progresión de la leucemia [298].

1.6.4.4. Función en el microambiente celular

La expresión de VEGFA en interacción con citoquinas, conduce a un efecto autocrino que estimula la proliferación y migración de las células endoteliales en la médula ósea [299]. Por otra parte, también se ha descrito que, además de la interacción con otros subtipos celulares del microambiente, la interacción con otros componentes puede promover la expresión de VEGFA [300]. De este modo, ensayos *in vitro* mostraron que células de LLC tratadas con componentes del microambiente como CD154 y LPA, incrementaron la expresión de VEGFA, favoreciéndose la protección frente a la apoptosis [301-302].

1.6.4.5. Función como factor pronóstico

Diferentes publicaciones han sugerido que la detección de un incremento en la expresión de VEGFA, puede constituir una herramienta útil en el pronóstico clínico de los pacientes con diferentes tipos de cáncer [282-284]. Los niveles de VEGFA en

pacientes con LLC son significativamente elevados en comparación a grupos control de estudio [303]. Además, tanto el nivel de expresión de VEGFA como el de su principal receptor VEGFR2, han sido superiores en los estadios avanzados Rai III y IV comparado a los estadios 0 y II [281]. Así mismo, en otro estudio se ha observado que la elevada expresión de VEGFA en el plasma de sangre periférica disminuyó después del tratamiento con fludarabina [303]. En relación con la progresión de la LLC, una elevada expresión de VEGFA se ha descrito como un posible factor predictivo de progresión clínica para la SLT de pacientes con estadios tempranos de la enfermedad [304]. Incluso se ha propuesto que el análisis de los niveles de expresión de VEGFA durante el pre-tratamiento, podría predecir una mejor eficiencia del tratamiento con quimioinmunoterapia en los pacientes con LLC [305]. La variabilidad genética del gen VEGFA se ha estudiado principalmente en tumores sólidos [277], sin embargo, recientemente también se está observando niveles de expresión de VEGFA variables en algunos tipos de leucemias. En este sentido, la expresión de VEGFA y las rutas de señalización asociadas, constituyen dianas potenciales para diferentes fármacos en el tratamiento de neoplasias hematológicas.

1.7. Tratamiento en la LLC

1.7.1. Criterios para el inicio del tratamiento

En el momento del diagnóstico, más de un 80% de los pacientes no requieren tratamiento. Actualmente, se recomienda que los pacientes recién diagnosticados, asintomáticos y estadios tempranos (Binet A, Rai 0) sean monitorizados regularmente sin administrar terapia alguna. Se ha comprobado que el inicio de la terapia en estas etapas no resulta beneficioso para incrementar la supervivencia [13, 306, 307]. Por otro lado, en pacientes en estadios intermedios (estadios I-II de Rai o B de Binet) o avanzados (III-IV de Rai o C de Binet), el tratamiento si es beneficioso y está indicado cuando haya evidencia de enfermedad activa determinada por la presencia de al menos uno de los criterios definidos según las recomendaciones del *International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia (IWCLL)* [3]. Por tanto, la linfocitosis aislada o la presencia de alteraciones citogenéticas como la delección 17p, son criterios para indicar el tratamiento.

1.7.2. Factores pronósticos que afectan la respuesta al tratamiento

Una reciente guía de consenso del Grupo Español de Leucemia Linfocítica Crónica, establece que diferentes factores pronósticos adversos asociados a la enfermedad pueden determinar la respuesta al tratamiento y la supervivencia de los pacientes [308]. Estos factores incluyen el estadio clínico, los valores séricos de la LDH y de la β 2-M, el patrón de infiltración medular o los marcadores de expresión de proteínas ZAP-70 y CD38. La detección de marcadores genéticos como el estado mutacional de los genes IgVH y las alteraciones citogenéticas más frecuentes como la deleción 11q y 17p, también se describen como factores importantes en la estimación de la progresión desde los estadios iniciales [308]. Por otra parte, aunque otros estudios proponen que la combinación de factores clínicos y genéticos, junto con la detección de las recientes alteraciones moleculares asociadas a LLC, podrían añadir información pronóstica relevante [73,309-312], aún no se ha establecido ningún índice pronóstico internacionalmente consensuado en el tratamiento la LLC [13].

1.7.3. Evolución de los tratamientos

Durante varias décadas la monoterapia con agentes alquilantes se ha empleado como tratamiento de primera línea en la LLC. Particularmente clorambucilo fue considerado el tratamiento estándar durante más de tres décadas. Actualmente este fármaco sigue siendo una opción apropiada para pacientes mayores o pacientes que no son capaces de tolerar una quimioterapia más intensa, debido a ciertas ventajas que presenta como su baja toxicidad, bajo coste y su administración oral [313]. Sin embargo, dentro de sus principales desventajas esta su baja o casi inexistente tasa de remisión completa y los efectos secundarios que se producen después de un uso prolongado (citopenias, mielodisplasia y leucemia aguda secundaria) [13]. A partir de los años 90, se incorporaron los análogos de purina solos o en combinación con agentes alquilantes. Entre los análogos de purina más usados en la LLC están la fludarabina, la cladribina y la pentostatina. Fundamentalmente, la fludarabina representa el componente mejor estudiado en el tratamiento de la LLC. En los ensayos clínicos realizados con fludarabina como agente único se alcanzó una mejor tasa de respuesta global frente a diferentes agentes alquilantes, sin embargo, no se

obtuvieron ventajas en cuanto a la supervivencia global [314,315]. Posteriormente, para mejorar la tasa de respuestas y la supervivencia, se utilizó la combinación de fludarabina con otros agentes quimioterápicos. Así, la combinación de fludarabina con agentes alquilantes como ciclofosfamida o mitoxantrone alcanzó mejores resultados [316, 317]. Además, diferentes grupos realizaron ensayos clínicos evaluando la adición de rituximab, un anticuerpo monoclonal anti-CD20, a la combinación de fludarabina y ciclofosfamida (FCR). Los resultados obtenidos han llevado a situar esta combinación como el tratamiento de elección en primera línea en pacientes con un estado físico óptimo al incrementar significativamente la tasa de respuestas y la supervivencia con respecto a la quimioterapia [318, 319]. Sin embargo, tratamientos de primera línea más eficaces en la LLC permanecen aún por elucidar. Existen pacientes que no responden a FCR y que presentan alteraciones genéticas de mal pronóstico asociadas. De esta manera, para los pacientes refractarios y en recaída hay controversia en cuanto a la elección del tratamiento.

A partir del Rituximab, se han desarrollado nuevos anticuerpos monoclonales como Obinutuzumab (GA101), un anticuerpo monoclonal anti-CD20 de tercera generación [320] y ofatunumab [322]. Además se han ido añadiendo a las pautas de tratamiento el uso de Bendamustina con características alquilantes y de análogo de purina [321], de inhibidores del BCR como Ibrutinib o Idelalisib o de antagonistas de Bcl-2 como venetoclax. También se están estudiando el uso de inhibidores de angiogénesis que bloquean VEGF como bevacizumab [323], inmunomoduladores como Lenalidomida que inhibe diferentes proteínas como VEGF [324], inhibidores dependientes de quinasas como flavopiridol que disminuye la expresión de Mcl-1 y XIAP, altamente expresados en LLC [13]. De esta manera, la diversidad de tratamientos disponibles junto con la heterogeneidad molecular de los pacientes, hace difícil la elección de un tratamiento para la práctica clínica habitual [325-327].

1.7.4. Elección del tratamiento de primera línea

El objetivo de la administración terapéutica en la LLC es aumentar la supervivencia global y obtener la mejor calidad de vida posible para el paciente, a

través de una máxima respuesta al tratamiento y una baja toxicidad. La elección del tipo de tratamiento de primera línea dependerá de las comorbilidades del paciente, es decir, si tiene o no una capacidad fisiológica adecuada, y de la presencia de alteraciones éticas como la delección 17p o la mutación del gen *TP53*, que definen a los pacientes de elevado riesgo biológico. [308].

En los pacientes que no presentan comorbilidades, el objetivo terapéutico es aumentar la SLP y la OS. Diferentes estudios recomiendan la combinación de FCR como el tratamiento más eficaz [97, 328]. Existen otros tratamientos alternativos como las combinaciones de rituximab - bendamustina (R-B), rituximab - fludarabina, rituximab - pentostatina - ciclofosfamida o rituximab - ciclofosfamida - mitoxantrone - rituximab que han sido evaluados en estudios de Fase II y mostrado buenos resultados clínicos. Además, pacientes con IgVH-M y ausencia de delección 11q o delección 17p, alcanzan remisiones de más larga duración con FCR [321, 329, 330, 331]. En el caso de pacientes que presenten comorbilidades, se pueden dividir a su vez en dos subgrupos: pacientes con una capacidad funcional comprometida por la presencia de comorbilidades moderadas asociadas y pacientes con fragilidad funcional incrementada por comorbilidades graves (paciente frágil). En el grupo de pacientes con comorbilidades moderadas, se incluyen a aquellos que no son candidatos a recibir FCR, cuya esperanza de vida les permita recibir tratamientos activos para alcanzar respuestas duraderas. En la literatura científica, no hay criterios que definan claramente este grupo de pacientes. Por otro lado, no suelen ser candidatos a tratamientos con análogos de purinas y las opciones actualmente recomendadas son combinaciones de R-B, Bendamustina en monoterapia y clorambucilo en combinación con anticuerpos monoclonales como obinutuzumab, ofatunumab o rituximab. Los pacientes con comorbilidades graves (paciente frágil) presentan una esperanza de vida corta como consecuencia de una importante afectación orgánica. En este caso, el objetivo terapéutico se centra en controlar los síntomas y tratar de mantener una calidad de vida óptima en el paciente. Se recomienda la administración de Clorambucil, Ciclofosfamida y corticoides, entre otros [308]. Recientemente se recomienda la administración de Clorambucilo junto a anticuerpos monoclonales en pacientes de

este grupo, normalmente de edad avanzada y sin delección 17p o mutación de TP53, lo que mejora la SLP respecto a los tratamientos en monoterapia [320]. Por último, en los pacientes de muy alto riesgo biológico, sería importante definir el grado de delección 17p en estos pacientes, debido a que en los diferentes estudios no hay puntos de corte establecidos de forma definitiva. Actualmente el tratamiento más aceptado es Ibrutinib en primera línea en casos con delección 17p o mutación TP53. Por otra parte, se ha descrito que el cariotipo complejo y la presencia de adenopatías voluminosas son los dos factores adversos más importantes en pacientes con delección 17p tratados con Ibrutinib [332].

1.7.5. Tratamiento en pacientes refractarios

Se define como casos refractarios a los pacientes con una ausencia de respuesta al tratamiento (no llegando a alcanzar una respuesta parcial) o progresión de la enfermedad, en los últimos 6 meses posteriores a la última terapia recibida [13]. Para definir los fármacos en el tratamiento de estos pacientes intervienen la presencia o no de comorbilidades y el estatus mutacional del gen *TP53*.

En pacientes refractarios sin comorbilidades, independientemente de si presentan o no alteraciones del gen *TP53* [330], se recomienda el tratamiento con ibrutinib o R-idelalisib, y en pacientes refractarios a estos fármacos, se recomienda fármacos nuevos como Venetoclax, o en su caso, Alemtuzumab en monoterapia [322] o en combinaciones con esteroides [331]. En el caso de pacientes con comorbilidades, el objetivo de tratamiento es controlar la sintomatología, mejorar la calidad de vida y también prolongar la SG. No hay estudios específicos en este subgrupo de pacientes. Para estos casos se suele administrar Rituximab con clorambucilo o con bendamustina, o alemtuzumab pero teniendo en cuenta su elevada toxicidad [308]. En general, la recomendación para los pacientes refractarios es administrar un tratamiento que pueda mejorar la respuesta clínica para a continuación, consolidar la respuesta con un trasplante alogénico de células hemotopoyéticas (AloTPH), si las condiciones del paciente lo permiten [334].

1.8. Tratamiento experimental con fármacos con actividad antitumoral *in vitro* en pacientes de LLC con pronóstico adverso

1.7.6.1. Forodesina

La Forodesina (BCX-177) es un análogo de nucleósidos de purina (PNA), que a diferencia de otros análogos de purina, no se intercala en el ADN, sino que actúa como un potente inhibidor de la fosforilasa de nucleósidos de purina (PNP). Esta enzima cataliza una reacción denominada fosforólisis, donde se hidroliza 2'-desoxiguanosina (dGuO) a guanina y 2'-desoxirribosa-1-fosfato [335]. Para el efecto citotóxico de la Forodesina, es necesaria la implicación de otra enzima, la desoxicitidina quinasa (dCK) que también presenta afinidad por dGuO. En condiciones normales, la afinidad por dGuO es mayor para PNP que para dCK. Sin embargo cuando PNP está bloqueada por acción de la Forodesina, dGuO no es hidrolizado, sino que es fosforilado a dGuO monofosfato (dGMP) por la enzima dCK, y finalmente dGMP se acumula intracelularmente como dGTP. Esta acumulación altera el equilibrio de los *pools* de nucleótidos intracelulares, lo que conduce a la inhibición de la síntesis del ADN, de la replicación celular y finalmente a la apoptosis celular [336]. Para la completa inhibición de la PNP por medio de Forodesina, se necesitan elevadas concentraciones intracelulares de dGuO. Por tanto, para que la Forodesina sea efectiva debe administrarse junto con dGuO [337].

El efecto de la Forodesina se estudió primeramente en la inhibición de la proliferación de las células T, en casos de leucemia linfoblástica aguda y linfoma cutáneo de células T [338, 339]. Se han realizado diferentes estudios en células de LLC, donde se observó que la Forodesina inducía apoptosis en condiciones *in vitro* mediante la fosforilación de p53 y la activación de p21 [336], y también mediante la activación de vías apoptóticas mitocondriales independientes de TP53, a través del decrecimiento de la proteína anti-apoptótica Mcl-1 [340]. Así, la actividad de la Forodesina en experimentos *in vitro* con células de LLC [341, 342] indica que podría ser útil el estudio de futuras combinaciones con otros fármacos que potencien su efecto.

1.7.6.2. Trióxido de arsénico (ATO)

El trióxido de arsénico (ATO) se ha usado principalmente como primera línea de tratamiento en la leucemia promielocítica aguda [343,344]. Sin embargo, ha sido parte de la medicina tradicional china, incorporándose a la medicina occidental como agente anti-tumoral a finales del siglo XIX [345]. Además, diferentes estudios muestran que ha sido útil en el tratamiento de varios desórdenes hematológicos como síndrome mielodisplásico, leucemia mieloide aguda y leucemia mieloide crónica [346-349]. Por otro lado, estudios pre-clínicos indicaron que puede inducir apoptosis e inhibir el crecimiento celular y la angiogénesis en diferentes tipos de células tumorales [350-353]. El complejo mecanismo de acción de ATO aún no es del todo conocido en la actualidad. En el caso de la LLC, son pocos los estudios que han abordado el efecto citotóxico de ATO. Sin embargo, se ha observado que ATO induce apoptosis en células de LLC mediante la activación de la quinasa JNK, lo que inhibe la vía de supervivencia PI3K/Akt/NF-Kb, constitutivamente activada en células de LLC. Esto da lugar a la disminución de NF-Kb y también de XIAP (ambos supresores de PTEN), lo que incrementa la expresión de la fosfatasa PTEN, que probablemente también aumente por acción directa de JNK. Por último, la activación de JNK lleva a la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), liberación del citocromo c, activación de caspasas y finalmente apoptosis [354-356].

Objetivos

2. OBJETIVOS

1. Análisis de la variabilidad genética del gen *VEGFA* como factor pronóstico en pacientes con LLC de reciente diagnóstico.

- Caracterización molecular de los polimorfismos genéticos del gen *VEGFA*.
- Análisis de la variabilidad genética en la susceptibilidad a LLC mediante un estudio caso-control.
- Estudio de asociación de los polimorfismos genéticos en subgrupos moleculares de pronóstico adverso y análisis de su influencia en la supervivencia.

2. Análisis de las alteraciones moleculares de los genes *ATM*, *BIRC3*, *SF3B1* (K700E) y *NOTCH1* (p.P2515fs*4) en pacientes con delección 11q detectada al diagnóstico y su impacto en la supervivencia

- Identificación, distribución y frecuencia de las variantes moleculares en los genes *ATM*, *BIRC3*, *SF3B1* (K700E) y *NOTCH1* (p.P2515fs*4).
- Estudio de la asociación de la delección 11q con las mutaciones detectadas y su correlación con variables de pronóstico desfavorable

3. Estudio del efecto citotóxico *in vitro* de combinaciones de fármacos y su correlación con alteraciones moleculares de pronóstico adverso en pacientes con y sin tratamiento previo

- Análisis del efecto citotóxico de los fármacos individuales y en combinación de trióxido arsénico, forodesina y fludarabina en células de LLC.
- Determinación del potencial efecto sinérgico de las combinaciones de los fármacos.
- Influencia de las alteraciones moleculares de riesgo en respuesta al efecto citotóxico de los fármacos.
- Análisis de vías de señalización de supervivencia en la respuesta a los fármacos e influencia del microambiente en la resistencia a los mismos.

Resultados

Pacientes y metodología

3. PACIENTES Y METODOLOGÍA

3.1. Muestras biológicas

3.1.1. Pacientes

En el presente estudio se evaluaron un total de 401 muestras de pacientes recién diagnosticados con LLC y 40 muestras de pacientes en progresión clínica. Las muestras proceden de cuatro hospitales pertenecientes al grupo GLIMCE: Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda, Hospital Universitario de Getafe, Hospital Universitario Severo Ochoa de Madrid y Hospital Universitario General de Valencia. En todos los casos, los pacientes fueron informados y se obtuvo su consentimiento firmado para participar en el estudio. Los análisis efectuados en este trabajo fueron evaluados y aprobados por el Comité ético del Hospital Puerta de Hierro (Comité Ético de Investigación Clínica Hospital Puerta de Hierro Majadahonda) y en su caso, por la Junta de Revisión de Bioética del Centro Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) y llevado a cabo siguiendo los principios de la Declaración de Helsinki. Las muestras biológicas de los pacientes analizados en esta tesis doctoral se agrupan en tres estudios diferentes. En el estudio de los polimorfismos genéticos, analizamos muestras de sangre periférica (SP) de 239 pacientes consecutivos recién diagnosticados. Para el estudio de alteraciones moleculares asociadas a LLC evaluamos 118 pacientes consecutivos al diagnóstico y 27 pacientes en progresión. Por último, en el estudio de las combinaciones de fármacos en pacientes con alteraciones de pronóstico adverso estudiamos un total de 35 pacientes incluyendo 21 muestras de SP de pacientes recién diagnosticados y 14 muestras de SP de pacientes que recibieron tratamiento previo.

3.1.2. Muestras control

Con el fin de determinar la distribución de los polimorfismos del gen *VEGFA* en la población española de la misma área, se estudiaron 183 individuos sanos de una población control provenientes del Departamento de Banco de sangre del Hospital Universitario Puerta de Hierro de Majadahonda. Todos los individuos firmaron un consentimiento informado para el estudio.

3.1.3. Líneas celulares

Las líneas celulares que se utilizaron para este estudio fueron: HS-5 (fibroblastoide) y HS-27A (epitelioide) obtenidas del biobanco ATCC (American Type Culture Collection; Manassas, VA, USA) y cultivadas en RPMI 1640 (Gibco) con 10% de suero bovino fetal (SBF, Sigma-Aldrich). La inmortalización de estas células estromales fue obtenida a partir de la médula ósea humana de donantes normales [357].

3.2. Obtención y purificación de las células mononucleadas: linfocitos B y granulocitos

Los linfocitos B se obtuvieron a partir de muestras de sangre periférica (fracción mononuclear) de pacientes con LLC -mediante gradiente de densidad por Ficoll (*Lymphocyte Isolation Solution Gradient*, Rafer, S.L. Zaragoza, España). Se diluyó la muestra de sangre en un volumen 1:1 con PBS 1X estéril o RPMI sin suero, y se añadió a la muestra de Ficoll (10ml). Se centrifugó la muestra a 2100 rpm, 15 minutos y sin freno en la centrífuga. Posteriormente, el gradiente de densidad permitió distinguir y aislar en la muestra un halo celular donde se localizó la fracción de linfocitos B. La muestra obtenida se lavó con PBS 1X estéril y se centrifugó a 1200 rpm durante 5 minutos. Si hubiera restos de sangre, se añade una solución de lisis durante 20 minutos, para lisar los eritrocitos que queden en la muestra.

Posteriormente se centrifugó a 1200 rpm durante 5 minutos y se eliminó el sobrenadante por decantación. Se repitió el proceso de lisis celular hasta que la muestra no tuviera restos de eritrocitos. El pellet celular final se resuspendió en 1ml de RPMI sin suero. Los linfocitos B obtenidos mediante este procedimiento, se congelaron a -80°C y posteriormente se preservaron en nitrógeno líquido en presencia de un 20% de dimetil sulfóxido (DMSO) y un 20% SBF hasta el momento de su utilización. Por otra parte, el aislamiento de los granulocitos, se realizó por el mismo procedimiento mediante Ficoll. En este caso, la capa de granulocitos que se aisló, se localizó justo por encima de la capa inferior de eritrocitos. Los granulocitos se aislaron para la posterior determinación del status mutacional (somático y/o germinal) de diferentes genes del estudio.

3.3. Extracción de ADN

El ADN genómico fue extraído a partir de linfocitos B o granulocitos obtenidos previamente mediante la purificación por Ficoll. La extracción de ADN se realizó mediante dos métodos diferentes:

3.3.1. Extracción de ADN mediante DNAzol

El procedimiento con DNAzol (MRC, Cincinnati, OH) se basa en el uso de una solución lisante de guanidina-detergente, que hidroliza el ARN y conduce a la precipitación selectiva del ADN del lisado. La muestra celular de partida (con al menos 30×10^6 células) se centrifugó 1200 rpm durante 5 minutos. Después de retirar el sobrenadante, al pellet se le añadió 1ml de DNAzol y se mezcló para homogeneizar la muestra. Posteriormente se añadió entre 800-1000 μ l de etanol 100%. El material que se separó del resto de la muestra se transfirió para su lavado con etanol al 70%. Se retiró todo el volumen del etanol al 70% y se añadió entre 200 μ l – 1ml de TrisHCl (10mM) dependiendo de la cantidad de ADN final que se obtuviera. Se agitó cuidadosamente y se colocó 24 horas a temperatura ambiente y posteriormente se incubó a 65°C durante 30 minutos - 1hora.

3.3.2. Extracción automática de ADN

Este método fue utilizado en la extracción de ADN de 183 individuos sanos. Se realizó mediante el kit de purificación Maxwell 16 Blood ADN (Promega Corp. Madison, CA) que emplea unas partículas paramagnéticas que se unen al ADN y posteriormente la solución se eluye en condiciones de baja salinidad. Posteriormente, la cantidad y calidad del ADN obtenido mediante el método de extracción manual o automática, se determinó utilizando un espectrofotómetro Nanodrop ND-1000 (NanoDrop Technologies. Newark, USA).

3.4. PCR convencional

Esta técnica fue empleada para validar las muestras genotipadas del gen *VEGFA*, y para la amplificación del exón 51 del gen *ATM* para su posterior secuenciación. Las secuencias de los cebadores correspondientes a las secuencias analizadas del gen *VEGFA* se muestran en la Tabla 3. Para realizar la PCR de las secuencias del gen *VEGFA* se emplearon los siguientes reactivos a un volumen final de 25 µl: 12.5 µl de Buffer Mix, 1 µl de cada cebador directo o Forward (F) y reverso o Reverse (R) a 10 µM, 5.3 µl de agua, 0.2 µl de la enzima Taq polimerasa y 5 µl de ADN a 20 ng/µl. Las condiciones del programa de amplificación fueron: 95°C 5 min, 95°C 15 s, 60°C 15 s, 72°C 30 s, 72°C 7 min durante 30 ciclos y un ciclo final de 4°C 5 min. Para la amplificación del exón 51 se emplearon: 12.5 µl de Buffer Mix, 1 µl de cada cebador F/R (10 µM), 9.3 µl de agua, 0.2 µl de la enzima EcoTAQ y 1 µl de ADN a 100 ng/µl, con sus respectivas condiciones del programa de amplificado: 95°C 5 min, 95°C 15 s, 54°C 15 s, 72°C 30 s, 72°C 7 min durante 30 ciclos y un ciclo final de 4°C 5 s. Los resultados obtenidos fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5%.

Tabla 3: Secuencias de los cebadores del gen *VEGFA*.

SNP	Secuencia (5' - 3')	Tamaño (pb)
rs699947	F - TGACTAGGTAAGCTCCCTGG	299
	R - ACTCTCCACATCTTCCCTAAGT	
rs833061	F - TCCAGATGGCACATTGTCA	481
	R - AAAGTGAGGTTACGTGCGGA	
rs2010963	F - TGTGGATTTTGGAAACCAGCA	228
	R - TCTGTCTGTCTGTCCGTCA	
rs25648	F - AGGAAGAGTAGCTCGCCGA	415
	R - TACGTGCGGTGACTCCG	
rs3025039	F - TGACAAGCCGAGGCGGT	519
	R - AACTCAAGTCCACAGCAGTCA	

3.5. Determinación y genotipado de polimorfismos

Las variantes polimórficas para llevar a cabo el estudio se seleccionaron en base a su descripción como marcadores genéticos, debido a su potencial efecto en la

variación de la expresión génica de *VEGFA* [358-360] y al desarrollo y progresión de diferentes tipos de cáncer [361-365].

La discriminación alélica se realizó mediante sondas TaqMan® MGB (Applied Biosystems, Foster City, CA) usando el 7500 Real Time PCR (Applied Biosystems). En un volumen final de 10 µl se utilizaron los siguientes reactivos por muestra: 0.25 µl de Genotyping Master Mix 2X, 5 µl de SNP Assay 40X, 3.75 µl de agua y 1 µl de ADN (20 ng/µl). Para las condiciones del programa de análisis, se realizó una pre-lectura a 60°C 30 s, una desnaturalización a 92°C 10 min y finalmente la amplificación: 92°C 15 s, 60°C 1 s y 60°C 30 s (40 ciclos). Para la validación del genotipado se seleccionaron determinadas muestras de ADN para su posterior secuenciación mediante el analizador 3130xl Genetic Analyzer Sequencer (Applied Biosystems).

3.6. Ensayos de detección de mutaciones somáticas

La detección de mutaciones somáticas de biomarcadores mediante PCR a tiempo real (*qBiomarker Somatic Mutation PCR*, en inglés) constituye una herramienta rápida y precisa que permite la detección de mutaciones somáticas en genes relevantes asociados a rutas biológicas importantes o enfermedades concretas. Esta técnica se basa en una amplificación que alcanza un límite de detección de hasta un 1% del alelo mutado en un *background* de ADN *wild type*.

El diseño del ensayo se basa en la tecnología ARMS® (*Amplification Refractory Mutation System*) que consiste en la discriminación alelo-específica del alelo mutado por la Taq polimerasa y la detección de la hidrólisis de una sonda marcada. Los cebadores ARMS están diseñados de forma complementaria al ADN que contiene la mutación. De esta manera la Taq polimerasa amplifica selectivamente sólo la secuencia del ADN mutado y no la del ADN *wild type*. Posteriormente, la detección de esta amplificación se realiza mediante la actividad exonucleasa 5'→3' de la Taq polimerasa, degradando una sonda de ADN que hibrida con el amplicón durante la etapa de extensión de la PCR. Esta sonda está doblemente marcada con un *reporter* y un *quencher*, de tal forma que no hay amplificación de la secuencia *wild type* cuando la

cercanía del *quencher* impide la fluorescencia del *reporter*. Sin embargo cuando hay reconocimiento por complementariedad y amplificación de la secuencia que porta la mutación, la enzima degrada la sonda, el *quencher* se separa del *reporter* y éste emite fluorescencia.

3.7. Técnica de HRM

La técnica de *High Resolution Melting* (HRM) fue utilizada con el objetivo de amplificar regiones exónicas de los genes *ATM* y *BIRC3* y detectar variaciones en las secuencias de ADN. El análisis se basa en la caracterización de muestras de ADN según los perfiles de curvas de *melting* durante un gradiente ascendente de temperatura. Es un método potente y de alto rendimiento que permite un *screening* mutacional con gran aplicabilidad. Se caracteriza por la utilización de un fluorocromo de tercera generación denominado R27 (Roche Diagnostics). Esta molécula tiene gran afinidad por el ADN de doble cadena, donde se intercala de forma saturante sin inhibir la reacción. A medida que aumenta la temperatura, disminuye la fluorescencia produciendo un perfil característico. Así, cada producto de PCR es identificado por su temperatura de *melting* (T_m) correspondiente a la temperatura en la cual la mitad del ADN de doble cadena está desnaturalizado.

Cuando la secuencia del producto de PCR presenta un cambio en homocigosis, se generan fragmentos homodúplex y cuando el cambio es heterocigótico se detectan fragmentos homodúplex y heterodúplex. Cada producto de PCR tiene diferente estabilidad, observada mediante el análisis de las curvas de *melting*. Las secuencias con variante en heterocigosis (formación de heterodúplex) presentan una T_m más baja que los ADN de doble cadena homocigotos (formación de homodúplex). Por tanto, la comparación de la fluorescencia en función de la temperatura permite detectar cambios de una sola base, pequeñas inserciones y deleciones, siendo un método rápido para genotipar variantes conocidas y también para detectar variantes desconocidas en la secuencia de ADN.

Para los ensayos, primeramente se determinó el límite de detección de la técnica. Para ello, se seleccionó una muestra de ADN con una variación genética confirmada previamente por secuenciación. Dicha muestra se obtuvo de un individuo con alrededor de un 97% de marcadores de linfocitos B CD5/CD19, lo que nos confirmó que la muestra de análisis (purificada previamente) mayoritariamente contenía linfocitos B. La muestra de ADN con la variante fue diluida serialmente en cantidades crecientes con una muestra de ADN *wild-type*. Se analizaron todas las diluciones de la muestra mediante una amplificación control para uno de los exones del gen *ATM*.

Tras el procedimiento, se detectó un límite de detección de al menos un 6% del alelo mutado. Una vez establecido el límite de detección de la técnica, se analizaron las muestras de ADN de los pacientes con LLC junto a sus respectivos controles (ADN *wild type*), para cada una de las secuencias del gen *ATM* (exones 2-63) y del gen *BIRC3* (exones 6-9). Los cebadores empleados para el análisis de las regiones codificantes del gen *BIRC3* se muestran en la Tabla 4 [155]. Los cebadores del gen *ATM* fueron diseñados (Tabla 5) y las reacciones de amplificación fueron optimizadas para cada exón (Ver diseño y optimización de los cebadores del gen *ATM*).

Tabla 4: Secuencias de los cebadores correspondientes a los exones del gen *BIRC3* [155].

Exón	Cebador	Secuencia (5'-3')	Tamaño (pb)
6	6F	CCTAATATGTGTTAAATTCTTTGTTCC	328
	6R	AGACTGATATCAAATCCTTATGAAAAT	
7	7F	TTTGAACATGTTTATGCTTGTTTTTC	349
	7R	AAGAGCGTATTTTCAATTGACTTAGA	
8	8F	TCATAGTAATGCTTTTTCTTTTCTCC	153
	8R	AGGCAGTTTGCTTCTTCAGTG	
9	9F	TGAAGAAGCAAACGCTTTTAT	268
	9R	AAAGTTTAGACGATGTTTTGGTTC	

3.7.1. Diseño y optimización de los cebadores del gen *ATM*

Se diseñaron un total de 77 parejas de cebadores directos y reversos (Tabla 5) para la amplificación de 62 exones codificantes del gen *ATM* (exones 2 al 63, RefSeq NM_000051.3). Para el diseño de los cebadores fueron empleados tres programas: *Primer blast*, *In-Silico* y *Operon Tool*, y se tuvieron en cuenta criterios establecidos por

la casa comercial para una óptima reacción durante la reacción de HRM en relación al tamaño del amplicón (de forma preferente entre 100-300 pares de bases), una temperatura de anillamiento cercana a los 60 °C y una purificación por HPLC. Cada cebador diseñado contenía las regiones flanqueantes y los fragmentos intrónicos adyacentes incluyendo los sitios de *splicing*.

Tabla 5: Secuencias de los cebadores diseñados para la amplificación del gen ATM.

Exón	Cebador	Secuencia (5' - 3')	Tamaño (pb)
2	2F	TTTCACACCTCTTTCTCTCTATATATGC	227
	2R	GTTACTAATCACACTTATTTCAAGGAAAAA	
3	3F	AGTGTGATTAGTAACCCATTATTATTTCCCTT	188
	3R	ATAAAGACAGTAAAATAAATTTGAATAGAATACCT	
4	4F	TGAAATTGCATTTTGTTTTCTTG	222
	4R	GCGACAGTAATCTGTTAAGCCA	
5	5F	AGTTGCCATTCCAAGTGTCTTAT	244
	5R	TTTCACACCTCTTTCTCTCTATATATGC	
6	6AF	ATCCTTTTTCTGTATGGGATTATGGAATA	213
	6AR	TCTGAGAACAGCATCCTTTGGTA	
	6BF	TATCTGAAACCTTCACAAGATGTTC	200
	6BR	ATGGTCTTGCAAGATCAAAGTATTTCA	
7	7AF	CCTGTTATACCCAGTTGAGCTTGT	171
	7AR	AATATAAAGCAAAGTGGGAAGAATTTTC	
	7BF	CCTCAAGACTTTGGCTGTCAA	213
	7BR	TTCAAAACAGTAAACATTTCTTTATACC	
8	8F	GCTTGACAGCTGAATAATTTGTG	276
	8R	AATGTGACATGACCTACTTACTGTACCT	
9	9F	CAGCGAAACTCTGGCTCAA	267
	9R	AAAATGACACTGAATGAGAAAATGG	
10	10AF	AGTACTATGGAAATGATGGTGATTCTC	229
	10AR	GCTGTTGGGGTAGAAGCTGA	
	10BF	GTGAGCTGTCTCCATTACTGATGA	242
	10BR	GGCTCCAAGTAAGCCAAAGTT	
	10CF	AATTTGGTGTATTACCTTTCGTGG	171
	10CR	CATAATGCATGCTGAACTTACCA	
11	11F	AAAGTCTTTGCCCTCCAAT	277
	11R	CAGCATGCTAATGAACTTAAATTACCT	
12	12F	CATGGCTTTTGGTCTTCTAAGTGAAGCTTTTTG	289
	12R	CAACCTCTTCCCTGGCTAACAGTTGC	
13	13AF	AAGGCAAAGCATTAGGTACTTGGT	248
	13AR	ATAATCCCAGAAGACAGCGATCCAGT	
	13BF	ACCAGTCCAGTATTGGCTTCT	175
	13BR	ATTTCTCCTTCCCTAACAGTTTACCA	
14	14AF	TAATTCTACAGTGATCTCCTAGTTGTTTTTA	299
	14AR	TTGGCTTTCTGGAATAATTCTGACTTA	
	14BF	TTTGGTGGGTGTCCTTGGCT	160
	14BR	AATGTAATAATTTTCACAGGAATACATTTTCAT	
15	15AF	ATAGTATGTCCAAGATCAAAGTACACTGT	299

	15BR	TCAAGGCTACAATGAGTTGTGACAAT	
16	16F	TCAAGGCTACAATGAGTTGTGACAAT	317
	16R	CATTCAAGATAGAGAAAACACTGTCTG	
17	17F	CCATCTTGAACATCTTTGTTTCTCTTCC	273
	17R	GGCCTCTTATACTGCCAAATC	
18	18AF	TGTTGTGCCCTTCTCTTAGTGT	181
	18AR	CTCCGAATATCAGCTGCCC	
	18BF	ACATGCTCAAGTTCTTGTGTTTGTGT	193
	18BR	TCAGCAACATCAGATAAAATCCAAGA	
19	19F	AGTAAATGATTTGTGGATAAACCTGAT	213
	19R	TCAACTTTATAAGCTTAACAGAACACA	
20	20F	TGTGTTCTGTTAAGCTTATAAAGTTGA	267
	20R	TTGCATTTCGTATCCACAGATAGCA	
21	21F	TAACCTTACAATAACCTTTTCAGTGA	231
	21R	TACTCATTAACAAACAAAGACTGCTT	
22	22F	AAGCAGTCTTTGTTTGTTAATGAGTA	246
	22R	GCCATCTGCAGCATTCCA	
23	23F	TATGCTTTGGAAAGTAGGGTTTGAA	267
	23R	ACTTGGTGAAGTAATTTATGGGATA	
24	24AF	TTCAGTTGGGATTTTATAATTGATTGTTA	222
	24AR	ATTCTCTTTCACAGATTTACACAGGGCAA	
	24BF	AGAAAATCTGTTTTACTGACGTTGATA	175
	24BR	ACAGTGACCTAAGGAAGCTTCTAAT	
25	25AF	AGTTGAATGAATGTTGTTTCTAGGTCC	213
	25AR	AGTATCTTGAAGATTTAGCCATTCCA	
	25BF	TAGACGTTTAGAAGACTTTATGGCAT	209
	25BR	AGGGGACTTGCTAAGTATTGT	
26	26AF	AAGAATGTTTAATAATCTGGATAAAGTATGA	254
	26AR	TTGGAAAGCAGTCTGTTAGAAGA	
	26BF	AGTCCATTGCTAATCAGATTCAAGA	231
	26BR	TATCATTACAGGAATGAAAAGTACATAA	
27	27F	ATCTTGTAATCTTGGACTTTGAGTCATCT	307
	27R	ACTTGTGAAGTTAGAGCTAGTTCT	
28	28F	TCATTTTGAAGTTCACTGGTCTAT	241
	28R	AGGAATGTTCTATTATTAACCTCATCAT	
29	29AF	TGTAGCCGAGTATCTAATTAAACAA	230
	29AR	AGTATAAATAACGTCTCGAAGAACA	
	29BF	TCACCTGTTTGTAGTTTATTACTGAAA	165
	29BR	AGGAAGAACAGGATAGAAAGACTGCTT	
30	30F	TAATTTTCCAGAACTTACTGGTTGTTGTT	262
	30R	TTAAATACCATTTTGAAGATGAGTCA	
31	31AF	TGGGTATCTTAGACGTAATTAGAACA	253
	31AR	AATACGCAAATCCTTAAAAACAACAT	
	31BF	AGTGATAGATAACAAGGATAATGAAAACCT	200
	31BR	TTGAAAAGTACTACTATGTTCTCTAATAAAA	
32	32F	ATTAAGTTTTATTTACAGGCTTAACCAA	284
	32R	TGACAATGAAACCAAGAGCAAGA	
33	33F	ATTCCCTACATATTTTTTGTAGCTACT	275
	33R	TCACGCAGCGCATGACTGTA	
34	34F	TATGATCTCTTACCTATGACTCTACTGA	310
	34R	TCCATGAATGTCATATTGAGATTACA	
35	35F	TCAGTGGAGGTTAACATTCATCAAGATT	268

	35R	ACAGAACTGTTTTAGATATGCTGGGTAT	
36	36AF	TGTTATACTCATTTTGTGTAGGAAAGGT	228
	36AF	ATTCACATTTTGTGCCTCCACTGT	
	36BF	TCATGACATTTGGATAAAGACACTGA	156
	36BR	AGCACTCTTTAGATAAACAGGTCA	
37	37AF	TAGCAGTATGTTGAGTTTATGGCA	254
	37AR	ATCCCTGAACATGTGTAGAAAGCA	
	37BB	ACTTTTGTGAGACTGTACTTCCATACTT	233
	37BR	ATCTTAAATCCATCTTTCTCTAGAACTGA	
38	38F	AGCAAGAATGCCTGGGACT	232
	38R	TGCAACACCTTCACCTAAAATAATCAT	
39	39F	TCAACATGCTTTTATTTTGATATTGAAGTTTA	284
	39R	ACCCTTATTGAGACAAATGCCAA	
40	40F	ATAGTATATGTATTCAGGAGCTTCCAA	210
	40R	ACCCAAAGTATGAGATAAATACTGTCA	
41	41F	ATAACATAACATTTAGAGTTGGGAGTT	256
	41R	TCCTTCATAAACAGAATTACTATACCGT	
42	42F	ACGGTATAGTAATTCTGTTTATGAAGGA	265
	42R	TGGCTGTGTAATATCCACCAA	
43	43AF	TAAATGATATTGTGAACTAAAATTTGTCTAAGT	227
	43AR	TGCTTGGTAATGAAGTTCTTCTAGTT	
	43BF	AGGATTGGATTATGAAAATAAAGACTGGTGT	181
	43BR	TATTCATAGAAGAGAAAAACAGTTGTTGT	
44	44F	TGTCCTTTGGTGAAGCTATTTATACAT	247
	44R	TCAGAAAAGAAGCCATGACATTAAT	
45	45F	TTAGTATTATTAGATCAGTAGCAAAGCCT	281
	45R	AGCTGCACTTTAGGATAACAAAGTCAT	
46	46AF	TCATTTCTCTTGCTTACATGAAGTCTAT	194
	46AR	AGTTGTCCATTTCTTTTCCATCA	
	46BF	AGCTTCTCAAGGACAGTGATTTTAGTT	224
	46BR	AGGAAAGTCAAGAGGTAAGATGACAT	
47	47F	ATGGTAGTAGTATCAGTAGTAAAAGTA	265
	47R	ATAACAGTAAACACTAATCCAGCCA	
48	48F	ACATGAAGGGCAGTTGGGT	217
	48R	AGTAACTATCTTAAGGGTTGCTCCA	
49	49AF	TGTATTACCTTAATTTGAGTGATTCTTTAGA	206
	49AR	ATGTAGTTTTCAATTCTTTGGTATTGAGTA	
	49BF	TGGAAATTATGATGGAGAAAGTAGT	243
	49BR	TGGTGAACATAAAATTGCACTTGTA	
50	50AF	TGTGTGATTTTGTAGTTCTGTAAAGTTCAT	198
	50AR	TGTTCTTCTCCACTTAATAAGCAGTTGA	
	50BF	AAAGAGGATCGTAAACGCTTCT	210
	50BR	AGGGGCTTATGTCTAAGTTTTTCAA	
51	51F	ATAACTTACTTGCTTAGATGTGAGAAT	337
	51R	AATGAGTAACTTATGTGATGTGAGA	
52	52AF	AGGCATACACGCTCTACCCA	246
	52AR	TATTCTGCTTCTTCTGGCTACCTCT	
	52BF	TACTGGCCTTAGCAAATGCAACA	167
	52BR	TTCTAGGAAAGACTGAATATCACACT	
53	53F	TCTGAGAAGTTTAAATGTTGGGTAGT	292
	53R	AAGCAGATTTACTTATTAGGCTCTAT	
54	54F	ACCTTCAATGCTGTTCTCAGTT	248

	54R	ATTTGCCAATATTTAACCAATTTTGACCTACAT	
55	55F	TAAGTGCAAATAGTGTATCTGACCTA	242
	55R	TTCATCACTAAAACCTCTAAGGGCTAA	
56	56F	AGATTGGTTTGAGTGCCCT	251
	56R	TATGTTTTTGGTGAACTAACAGAAGTA	
57	57F	TGCACTGACTCTGATAGCTGAAT	272
	57R	TAATCTTACAATAACCTTTAATTTTGGGTGT	
58	58AF	TATCCTGTTTCATCTTTATTGCCCT	249
	58AR	AGCCAATCGCTTCTCAAACCAAATA	
	58BF	AGAGAAATATGAAGTCTTCATGGATGT	190
	58BR	TGCCAAACAACAAAGTGCTCAATCT	
59	59F	TAAACTACTTAAAGATTATACCAAGTCAGT	271
	59R	TTGGTAGGCAAACAACATTCCAT	
60	60F	TAAAGTTCACATTCTAACTGGAAAGAAAGTA	254
	60R	ATGCCCAGCCCATGTAATTTTGA	
61	61F	ACAACATTGGTGTGTAACAAAATCCGT	202
	61R	AGTGCTCTTCACATCAGTGACTT	
62	62F	TACTGGTTCTACTGTTTCTAAGTATGT	249
	62R	AAACTGACAACAGGACCTTCTTA	
63	63AF	TCCCAAGGCCTTTAAACTGTTCA	195
	63AR	TGGGGTCTATGGCCTGCT	
	63BF	TACAAGAGAAACTGAAAGGAGTGGAA	209
	63BR	TGTTGGCAGGTTAAAAATAAAGGCT	

Tanto para el gen *ATM* como para el gen *BIRC3*, se optimizaron las condiciones específicas de cada uno de los cebadores para la amplificación de los exones correspondientes (Tablas 6 al 10).

Tabla 6: Condiciones de PCR-HRM para los exones 2, 3, 4, 5, 9, 11, 13A, 17, 23, 24B, 25A, 25B, 33 y 40.

Reactivos	Volumen
Master Mix 2X	5 µl
MgCl ₂	1.6 µl
Mix de Primers Forward/Reverse 1µM	2 µl
Agua	-
DNA (15ng/µl)	2 µl
Volumen final: 10.6 µl, Concentración final de MgCl ₂ 3.77 mM. Mezcla de Primers 190 nM, Programa de 55 ciclos: 95°C 10 s, 53-65°C 15 s, 72°C 30 s	

Tabla 7: Condiciones de PCR-HRM para los exones 29A, 28, 41, 27 y 30.

Reactivos	Volumen
Master Mix 2X	5 μ l
MgCl ₂	2 μ l
Mix de Primers Forward/Reverse 1 μ M	2 μ l
Agua	-
DNA (15ng/ μ l)	2 μ l
Volumen final: 11 μ l, Concentración final de MgCl ₂ 4.5 mM. Mezcla de Primers 180 nM, Programa de 55 ciclos: 95°C 10 s, 53-65°C 15 s 72°C 30 s	

Tabla 8: Condiciones de PCR-HRM de los exones 7A, 7B, 10A, 10B, 10C, 12, 18A, 22, 29B, 36A, 36B, 37A, 38, 39, 46A, 46B, 47, 48 y 50A.

Reactivos	Volumen
Master Mix 2X	5 μ l
MgCl ₂	0.8 μ l
Mix de Primers Forward/Reverse 1 μ M	1.2 μ l
Agua	1 μ l
DNA (15ng/ μ l)	2 μ l
Volumen final: 10 μ l, Concentración final de MgCl ₂ 2 mM. Mezcla de Primers 120 nM, Programa de 55 ciclos: 95°C 10 s, 53-60°C 15 s, 72°C 20 s	

Tabla 9: Condiciones de PCR-HRM de los exones 13B, 14B, 15, 18b, 26B, 31A, 31B, 42, 43A, 43B, 49A, 50B, 54, 55, 56, 57, 58B, 59, 60, 61, 62, 63A y 63B.

Reactivos	Volumen
Master Mix 2X	5 μ l
MgCl ₂	1.6 μ l
Mix de Primers Forward/Reverse 1 μ M	1.2 μ l
Agua	0.2 μ l
DNA (15ng/ μ l)	2 μ l
Volumen final: 10 μ l, Concentración final de MgCl ₂ 2 mM. Mezcla de Primers 120 nM, Programa de 55 ciclos: 95°C 10 s, 53-60°C 15 s, 72°C 20 s	

Tabla 10: Condiciones de PCR-HRM de diferentes exones del gen *ATM*.

Exones	Master Mix2X	MgCl ₂	Primers Forward/Reverse 1μM	DNA (15ng/μl)
E6B	5 μl	2 μl	1.2 μl	2 μl
34	5 μl	1.6 μl	1.8 μl	2 μl
37B	5 μl	2 μl	1.2 μl	2 μl
44	5 μl	1.6 μl	2.2 μl	2 μl
53	5 μl	1.6 μl	2.2 μl	2 μl
52A*	5 μl	1.6 μl	0.8 μl	2 μl
52B*	5 μl	1.6 μl	0.8 μl	2 μl

*En la reacción se añaden 0.6 μl de agua. Programa de 55 ciclos: 95°C 10 s, 53-60°C 15 s, 72°C 20 s.

Exones	Master Mix2X	MgCl ₂	Primers Forward/Reverse 1μM	DNA (15ng/μl)
6A	5 μl	1.6 μl	2 μl	2 μl
14A	5 μl	2.1 μl	2 μl	2 μl
24A	5 μl	2 μl	2 μl	2 μl
26A	5 μl	2.1 μl	2 μl	2 μl
58A	5 μl	1.6 μl	2.6 μl	2 μl

Programa de 55 ciclos: 95°C 10 s, 53-65°C 20 s, 72°C 45 s.

Exones	Master Mix2X	MgCl ₂	Primers Forward/Reverse 1μM	DNA (15ng/μl)
19	5 μl	2.4 μl	2 μl	2 μl
20	5 μl	2 μl	2.2 μl	2 μl
32	5 μl	1.6 μl	2 μl	2 μl
35	5 μl	1.6 μl	2 μl	2 μl
45	5 μl	2.4 μl	1.8 μl	2 μl

Programa de 55 ciclos: 95°C 10 s, 53-65°C 15 s, 72°C 30 s.

El proceso de amplificación, detección y análisis de las variantes moleculares mediante el sistema *Light Cycler*® 480 (Roche Molecular Systems) se establece en cuatro etapas (Tabla 11):

1. Pre-incubación: Proceso donde tiene lugar la activación de la enzima y desnaturalización del fragmento de ADN (Temperatura 95°C).
2. Amplificación: Condiciones específicas de secuencia.

- 3. *High Resolution Melting*: Se determinan los diferentes patrones de curvas de *melting* de cada amplicón.
- 4. Enfriamiento: Proceso en el que las cadenas de ADN de cadena sencilla se rehibridan.

Tabla 11: Condiciones de amplificación de la técnica HRM.

Nº Ciclos	1		55	
Nombre del programa	Pre-Incubación		Amplificación	
Temperatura (°C)	95		60/65*	72
Modo de adquisición	Ninguno		Ninguno	Unico
Tiempo	10 min		10s **	20s **
Velocidad de rampa (°C/segundo)	4,4		2,2	4,4
Adquisición (por °C)	-		-	-
Temperatura (°C)	0		53 *	0
Salto de Temperatura (°C)	0		0.5	0
Ciclo	0		1	0

Nº Ciclos	1				1
Nombre del programa	High Resolution Melting				Enfriamiento
Temperatura (°C)	95	40	60	95	40
Modo de adquisición	Ninguno	Ninguno	Ninguno	Continuo	Ninguno
Tiempo	1 min	1 min	0.01 s	-	10 s
Velocidad de rampa (°C/segundo)	4.4	2.2	1	0.02	2.2
Adquisición (por °C)	-	-	-	25	-
Temperatura (°C)	-	-	-	-	0
Salto de Temperatura (°C)	-	-	-	-	0
Ciclo	-	-	-	-	0

* Rango de Temperatura que oscila entre los 60°C o 65°C dependiendo de los cebadores empleados. ** Temperatura que varía según los cebadores utilizados.

3.8. Secuenciación automática

La secuenciación automática está basada en el método enzimático originalmente descrito por Sanger y se caracteriza por el marcaje fluorescente de los dideoxinucleótidos trifosfato (ddNTPs). Este marcaje es diferente para cada una de las bases lo que permite la identificación de cada una de ellas según la longitud de onda de la fluorescencia emitida. Primeramente la muestra fue amplificada con cebadores

específicos. Posteriormente se realizó la purificación de 5 µl de la muestra del ADN de partida, se añadió 2µl de Exosapit y se colocó la muestra en un termociclador a 37°C 15 minutos y 80°C 15 minutos. Posteriormente se realizó la reacción de secuenciación con 2 µl del reactivo Big Dye 1.1 (Applied Biosystems) empleado para fragmentos inferiores a 400 pares de bases, 1 µl de cebador directo o reverso, 1 µl de Buffer de elución, 5 µl de agua y 1 µl del producto de PCR purificado en el paso anterior. Para la reacción se utilizó un termociclador con el siguiente programa de amplificación: 96°C 1 min, 96°C 10 s, 50°C 5 s, 60°C 35 s y 4°C 5 min. A continuación se realizó la purificación con resina (BDX) de cada muestra (3µl del producto de la reacción de secuenciación) añadiendo 10 µl de BDX y 45µl de Buffer por muestra en un agitador de placa durante 30 minutos. La muestra obtenida de esta segunda purificación se analizó en un secuenciador capilar automatizado ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems, Foster City, CA).

3.9. Cultivo de células primarias

Las células mononucleadas que se obtuvieron mediante el proceso de extracción y purificación de sangre periférica, correspondieron a una población de linfocitos B CD19+ con una pureza >90% de las células mononucleadas, determinado por citometría de flujo mediante el BD FACScalibur flow cytometer (San Jose, CA, USA). Para los ensayos de cultivos celulares, todas las células mononucleadas aisladas fueron congeladas a -80°C, para que fueran sometidas previamente a las mismas condiciones de partida. Posteriormente, las células se descongelaron en RPMI 1640 con 10% SBF a 37°C y se centrifugaron a 1500 rpm durante 10 minutos. La viabilidad celular posterior a la descongelación fue determinada mediante marcaje con anexina V-FITC. Posteriormente, las células fueron resuspendidas en medio de cultivo completo con RPMI 1640 con L-glutamina (Gibco) suplementado con 10% de SBF (Sigma-Aldrich) y penicilina 100U/ml y estreptomicina 100 µg/ml (Sigma-Aldrich). Las células se mantuvieron en cultivo en una atmósfera húmeda a 37°C y 5% CO₂ durante al menos 1 hora antes de la adición de los fármacos correspondientes. El conteo celular se realizó en una cámara de Neubauer para determinar la concentración celular para cada ensayo. Posteriormente se incubaron con los fármacos a estudiar a una concentración de 100.000 células/pocillo.

3.10. Ensayos de co-cultivos con líneas celulares

Para realizar el cocultivo de células estromales con células de LLC, primeramente las células estromales se depositaron sobre pocillos previamente tapizados con 0.2% de gelatina en PBS 1X estéril durante 4 a 6 horas a 37°C. Pasado este tiempo, se añadió 15-20 ng/ml TNF α al cultivo de células estromales HS-27A. La estimulación con TNF α es un requerimiento previo para que las células HS-27A expresen el ligando de integrinas VCAM-1.

La incubación de HS-27A estimuladas (25×10^3 células/pocillo) y de HS-5 (40×10^3 células/pocillo) se realizó durante toda la noche a 37°C con 5% CO $_2$ para que ambas líneas celulares formen monocapas confluyentes, comprobándose en un microscopio de contraste de fases. Después de la incubación, se descongelaron las células de LLC ($7-8 \times 10^6$ células/ml) y se incubaron durante 1h a 37°C. Posteriormente las células de LLC (20×10^5 células/pocillo) fueron añadidas a las monocapas de células estromales o fueron cultivadas en suspensión para la comparación. La incubación se realizó durante 2h a 37°C para permitir la adhesión entre las células estromales y las células de LLC. A continuación, se cultivaron en ausencia de fármacos, con el vehículo (5 μ l DMSO) y con los fármacos: 1 μ M de ATO, 5 μ M de fludarabina y la combinación de ambos fármacos, durante 48h de incubación. Después se realizó la medición de la viabilidad celular de las células de LLC con Anexina V. Para ello, fueron recogidas mediante lavados con RPMI puro, con mucho cuidado para no despegar las células estromales del fondo del pocillo.

3.11. Determinación de la viabilidad celular/apoptosis por citometría de flujo

La determinación de la viabilidad celular en los cultivos celulares se llevó a cabo cuantificando los residuos de fosfatidilserina marcados con Anexina V con isotiocianato de fluoresceína (Anexina V-FITC; Immunostep, Salamanca, Spain). Durante el proceso de apoptosis celular, estos fosfolípidos pasan de la capa interna (condiciones normales) a localizarse en la capa externa de la membrana plasmática, permitiendo la identificación de las células apoptóticas. La muerte celular además de producirse por apoptosis, también puede darse por necrosis celular. En este caso la

cuantificación se realiza mediante el marcaje con yoduro de propidio (IP; Sigma-Aldrich). Durante este proceso la membrana plasmática se permeabiliza permitiendo la entrada del IP hasta el núcleo celular, que al ser un agente con fluorescencia permite marcar la degradación del ADN identificando a las células necróticas.

Para este análisis, fueron cultivados 2×10^5 linfocitos B en suspensión durante 24 y 48 horas en 100 μ l de RPMI 0.1% SBF con o sin los diferentes fármacos empleados. En las mismas condiciones, se cuantificó la respuesta celular de las células cultivadas en presencia de estroma. Los linfocitos B (2×10^5) se lavaron en 300 μ l de Tampón de unión a Anexina (Inmunostep, Salamanca, Spain) conteniendo 1 μ l de Anexina V-FITC y 1,5 μ l de IP. La viabilidad celular se determinó usando un citómetro de flujo de cinco colores FC500 (Beckman Coulter Inc., Fullerton, CA, USA), tomándose como células viables aquellas células Anexina V-/IP-. La información obtenida fue posteriormente normalizada a 100 y analizada mediante el software CompuSyn (BioSoft, Cambridge, UK), que permite calcular el índice de combinación basado en el algoritmo de Chou y Talalay.

3.12. Análisis de proteínas mediante *Western blotting*

$10-12 \times 10^6$ células de LLC fueron cultivadas durante 48 horas con o sin fármacos individuales, con sus respectivas combinaciones y vehículo, para la obtención de los lisados celulares totales. Tras los diferentes tratamientos a los que fueron sometidas las células en cultivo, se determinó la viabilidad celular por marcaje con Anexina V-FITC y fueron lisadas añadiéndoles un tampón de lisis a 20 mM de Tris-HCl pH 7.5, NaCl 137mM, glicerol 10%, NP40 1%, NaF 1mM, Na_3VO_4 1mM suplementado con inhibidores de proteasas y fosfatasas (Roche Diagnostics). Las muestras se incubaron durante 20 minutos a 4°C. Se centrifugaron los extractos a 13000 rpm, durante 10 minutos a 4°C, y finalmente se obtuvo el sobrenadante que contenía la fracción de los lisados celulares.

Se determinó la concentración proteica mediante métodos de cuantificación (BCA protein, Bio-Rad Laboratorios, Hercules, CA) en un espectrofotómetro Multiskan

Bichromatic microplate reader (Labsystems) a 540 nm. Se emplearon geles de acrilamida del 10-12% dependiendo del tamaño de la proteína a estudiar. Posteriormente, fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa o PVDF (Bo-Rad) en un tampón de transferencia a 120V durante 1 hora y 20 minutos. Después de la transferencia, las membranas fueron bloqueadas con TBS-Tween 0.1% (TBS-T) con 5% BSA (Albúmina de suero bovino, Roche Diagnostics) durante 1 hora en agitación. Posteriormente las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios (Tabla 12) correspondientes en TBS-T 0.1% con 5% BSA durante 16h a 4°C en agitación constante. Las diluciones y los tiempos de incubación se optimizaron para cada anticuerpo. Después se lavaron las membranas 3 veces por 5 minutos con TBS-T.

Tabla 12: Anticuerpos primarios y secundarios empleados en el estudio.

Anticuerpo	Casa comercial	Referencia	Especie reconocida
Anticuerpos primarios			
Bax	Santa Cruz Biotechnology	sc-526	Conejo
Bcl-2	Santa Cruz Biotechnology	sc-509	Ratón
Bim	BD Pharmigen	559685	Conejo
Mcl-1	Santa Cruz Biotechnology	sc-819	Conejo
Vinculina	Sigma-Aldrich	V9131	Ratón
p-Akt (T308)	Cell Signaling Technology	2965S	Conejo
p-ERK 1/2 (T202/Y204)	Cell Signaling Technology	9101S	Conejo
Anticuerpos secundarios			
Igsde conejo (HRP)	Dako	P0448	Conejo
Igsde ratón (HRP)	Dako	P0447	Ratón

Tras el lavado, se incubaron con los respectivos anticuerpos secundarios marcados con HRP, excitables con el kit de quimioluminiscencia ECL (Amersham) durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de la detección de la primera proteína en una membrana, se procedió a la identificación de múltiples proteínas en la misma membrana. Para ello, la membrana se lavó con TBS-T durante 10 minutos y después 3 lavados de 30 minutos incubándolo con un buffer compuesto de 1% de glicina pH 2.2, SDS 1%, NP-40 0.0005% a temperatura ambiente. A continuación las membranas se lavaron con TBS-T con 5% BSA durante 1 hora, para su posterior incubación con los respectivos anticuerpos primarios y secundarios (Tabla de anticuerpos Tabla 13). La detección de las proteínas se realizó con el analizador de quimioluminiscencia LAS 3000 (Fujifilm Global Lifescience, Düsseldorf, Germany) y la

cuantificación de las bandas proteicas se llevó a cabo usando el programa MultiGauge V3.0 (Fujifilm Global Lifescience, Düsseldorf, Germany). La vinculina fue usada como control interno para representar las cuantificaciones relativas de las proteínas del estudio.

3.13. Análisis estadístico

El test χ^2 de *Pearson* empleado para el análisis de asociación entre las variables clínicas y/o moleculares, así como todos los análisis estadísticos de supervivencia de la tesis doctoral, fueron realizados usando el programa estadístico SPSS 15.0 (Chicago, IL) con un nivel de significancia de $p < 0.05$.

3.13.1. Frecuencias alélicas y genotípicas

Para el análisis de los SNPs del gen *VEGFA*, primeramente se estimaron por conteo manual las frecuencias alélicas y genotípicas. Las frecuencias genotípicas se estimaron directamente calculando la proporción de individuos de cada genotipo. A partir de estas frecuencias, se calcularon las frecuencias alélicas de cada SNP, se duplicó la muestra y posteriormente se estimó la proporción de cada alelo. Para cada SNP de la población control y de pacientes, se determinó la frecuencia del alelo menos común o alelo menor (MAF).

3.13.2. Equilibrio Hardy-Weinberg (HWE)

Se evaluó el ajuste de los datos de las MAF de cada SNP mediante al equilibrio de Hardy-Weinberg (HWE), aplicando una prueba χ^2 con un grado de libertad y con un intervalo de confianza del 95% mediante el programa *Haploview*. El principio de este equilibrio determina qué frecuencias deben observarse en la población para cada genotipo en función de las frecuencias alélicas, indicando que una población permanece en equilibrio mientras no actúen determinados factores. Antes de realizar un análisis de asociación, es necesario comprobar si se cumple el principio HWE en la muestra de individuos control como representantes de la población general, cuando en el análisis se obtiene $p < 0.05$. Una desviación de este equilibrio puede indicar que el

método de análisis puede estar sesgado, favoreciéndose la detección de un genotipo frente a otro en la genotipificación.

3.13.3. Análisis del desequilibrio de ligamiento

El concepto de haplotipo se define como un conjunto de alelos de distintos loci que se localizan en un mismo gen y que se transmiten juntos por encontrarse en desequilibrio de ligamiento (LD). El análisis de los haplotipos y sus frecuencias para el gen *VEGFA*, se estimó en base a un algoritmo Bayesiano usando el programa *Phase*. El análisis del desequilibrio de ligamiento (LD) se realizó mediante el software *Haploview*. El LD para los alelos de dos SNPs distintos se estimó desde los parámetros D' (coeficiente de desequilibrio de ligamiento normalizado), r^2 (coeficiente de correlación) y LOD (algoritmo de la probabilidad relativa de que dos loci estén ligados para una determinada fracción de recombinación). El parámetro D' mide la asociación entre dos SNPs e informa como de aleatoria es su distribución y sus valores oscilan entre 0 y 1, reflejando $D'=0$ una independencia completa entre dos SNPs y $D'=1$, el ligamiento completo. El parámetro r^2 oscila entre 0 y 1, siendo $r^2=1$ cuando dos alelos se encuentran en completo LD, y por último LOD, presenta valores entre 0 y 2, indicando un elevado LD cuando $LOD \geq 2$ y $LOD \leq 2$ cuando no hay LD.

3.13.4. Análisis de asociación entre variables

Se realizaron diferentes análisis de asociación genética, como el test χ^2 de Pearson que se usó para evaluar diferencias significativas entre variables categorizadas, como las variables clínicas, biológicas y moleculares del estudio de mutaciones somáticas, o el análisis de las variables entre los grupos de controles y pacientes. Por otra parte, para analizar el nivel de significación estadística de los resultados obtenidos en los ensayos dosis-respuesta, el test *t-student* de dos tallos fue el parámetro seleccionado, dado el número de muestras del análisis.

El valor de la *Odds ratio* (OR) fue empleado para medir los riesgos relativos entre las frecuencias de los alelos, genotipos y haplotipos, así como de los modelos de herencia dominante, recesiva y aditiva. La OR es la probabilidad de que un

determinado evento ocurra frente a lo contrario y su objetivo consiste en cuantificar la magnitud de la asociación entre un posible factor de riesgo y una determinada enfermedad, con un intervalo de confianza del 95%. Si el valor del $OR < 1$, el factor se denomina protector y si $OR > 1$ el factor implica riesgo. En el caso del modelo dominante (homocigoto dominante + heterocigoto vs homocigoto recesivo), se asume que la copia de un alelo es suficiente para modificar el riesgo, en el modelo recesivo (homocigoto dominante vs heterocigoto + homocigoto recesivo) se asume que son necesarias dos copias para modificar el riesgo y en el modelo aditivo, cada copia modifica el riesgo en una cantidad aditiva.

3.13.5. Análisis de supervivencia

La supervivencia global (SG) se define como el intervalo de tiempo entre la fecha del diagnóstico y la muerte o último seguimiento del paciente. La supervivencia al primer tratamiento (SLT) se define como el intervalo de tiempo entre la fecha de diagnóstico y el primer tratamiento o la fecha del último seguimiento para los pacientes que no recibieron tratamiento. Los datos de supervivencia global que no fueron determinados a fecha del último seguimiento del paciente fueron censurados. La SG fue estimada mediante el método Kaplan-Meier y las distribuciones de las curvas de SG fueron evaluadas usando el test long-rank de Mantel. En el análisis de los polimorfismos la SG fue analizada considerando sólo las muertes como consecuencia de la LLC y en el análisis de las mutaciones somáticas, fueron evaluadas en paralelo tanto las muertes causadas por LLC como las que fueron debidas a otras causas.

Los análisis univariante y multivariante fueron realizados usando los modelos de regresión de Cox con el fin de evaluar el impacto pronóstico independiente de cada variable. En el caso del análisis univariante de las mutaciones del gen *ATM* y la delección 11q, fueron analizados 108 de los 118 pacientes del estudio. No fueron incluidos los pacientes que además presentaban delección p53 ($n=10$). El efecto pronóstico de esta delección al ser de elevado riesgo (asociada a una menor SG) pudo interferir en la evaluación de la supervivencia de los pacientes con inactivación bialélica del gen *ATM*. En el análisis multivariante del estudio de los polimorfismos, no se incluyó la variable

de las alteraciones cromosómicas, por presentar colinealidad con otros factores pronósticos (deleción 11q y deleción 17p corresponde a Δ ATM y Δ TP53, respectivamente). Las variables CD38 y ZAP70 también fueron excluidas del análisis debido a la elevada tasa de valores perdidos.

3.13.6. Índice de combinación

Para el análisis del efecto citotóxico de la combinación de fármacos, los datos se evaluaron mediante el índice de combinación (IC) basado en el algoritmo de Chou and Talay, empleando el programa CompuSyn (BioSoft, Cambridge, UK). Cuando el valor de $IC < 1$ indica sinergismo en la combinación de fármacos, un $IC = 1$ indica aditividad y un $IC > 1$ muestra una interacción antagónica entre los fármacos. Además, los datos se analizaron mediante el programa GraphPad InStat v3.06 (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

4. RESULTADOS

En esta sección se exponen los resultados de la presente tesis doctoral divididos en tres estudios. En primer lugar se detallan los resultados obtenidos del estudio de los polimorfismos del gen *VEGFA* y su impacto en la supervivencia global de pacientes al diagnóstico con diferentes características moleculares. En segundo lugar se describen los resultados procedentes del análisis mutacional de genes implicados en la patogénesis de la LLC en pacientes con delección 11q (*ATM*, *BIRC3*, *SF3B1* y *NOTCH1*) y su implicación en el pronóstico y progresión de la enfermedad. En tercer lugar, se describen los resultados obtenidos de la evaluación del efecto citotóxico de la combinación de determinados fármacos, para potenciar su eficacia en el tratamiento de pacientes con características moleculares adversas.

4.1. Análisis de la variabilidad genética del gen *VEGFA* en un estudio caso-control

4.1.1. Análisis de las características biológicas entre ambas cohortes

La cohorte de los 239 pacientes estuvo compuesta por 136 varones (56.0%) y 103 mujeres (43.1%). Los pacientes presentaron una edad media de 68 ± 12 años. Por otro lado, la muestra de 183 individuos sanos estuvo compuesta por 103 varones (56.3%) y 80 mujeres (43.7%), con un ratio de varones frente a mujeres de 1.29:1. No detectamos diferencias significativas entre el grupo de pacientes analizados y los individuos sanos en relación al género ($p=0,89$) ni a la edad ($p=0.09$).

4.1.1.2. Determinación de las variaciones de interés del gen *VEGFA*

Para evaluar si la variabilidad genética del gen *VEGFA* influye en el pronóstico de los pacientes con LLC realizamos una selección de determinados polimorfismos mediante una revisión bibliográfica de diferentes estudios. Los SNPs seleccionados fueron rs699947 (-1540C>A) y rs833061 (-460T>C) localizados en la región promotora, los SNPs rs2010963 (405C>G) y rs25648 (1032C>T) en la región 5'UTR y el SNP rs3025039 (1689C>T) en la región 3'UTR. Las respectivas posiciones polimórficas

fueron determinadas en relación a la secuencia de referencia NM_001171630,1 (Genbank) (Figura 8).

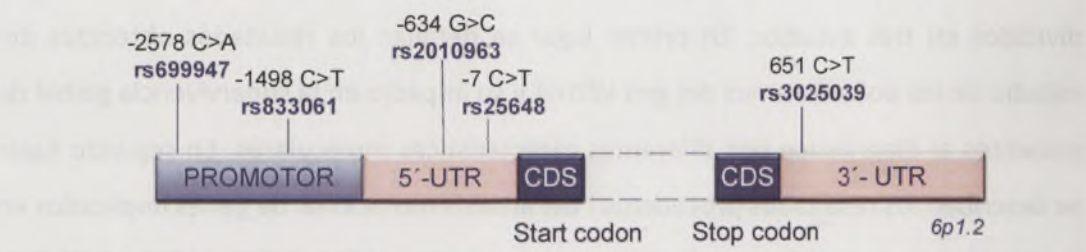


Figura 9: Posición genómica de los polimorfismos seleccionados del gen VEGFA.

4.1.3. Determinación y distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas

Para evaluar el potencial efecto de la variabilidad genética del gen VEGFA en el desarrollo de la LLC, primeramente se estimaron las frecuencias genotípicas. Estos resultados se obtuvieron a partir de los datos adquiridos mediante la genotipificación por PCR a tiempo real, en la serie de pacientes e individuos sanos procedentes de la misma área de análisis (Tabla 12).

Tabla 13: Distribución de las frecuencias genotípicas del gen VEGFA. Polimorfismos estudiados en el grupo de pacientes y el grupo control.

SNP	Genotipo	LLC (n)	%	Control (n)	%	χ^2	p-valor
rs699947	AA	50	20.9	30	16.4	1.7	0.42
	CC	77	32.2	67	36.6		
	AC	112	46.9	86	47.00		
rs833061	CC	50	20.9	30	16.4	1.6	0.45
	TT	73	30.5	63	34.4		
	CT	116	48.5	90	49.2		
rs2010963	GG	95	39.7	70	38.3	2.28	0.32
	CC	26	10.9	29	15.8		
	GC	118	49.4	84	45.9		
rs25648	CC	168	70.3	137	74.9	4.2	0.12
	TT	2	0.8	5	2.7		
	CT	69	28.9	41	22.4		
rs3025039	CC	178	74.5	146	79.8	2.9	0.23
	TT	4	1.7	5	2.7		
	CT	57	23.8	32	17.5		

A partir de las frecuencias genotípicas se calcularon las frecuencias alélicas. Con estos resultados, analizamos las frecuencias del alelo menor (MAF) de cada variante, para la necesaria selección de variantes cuya distribución alélica sea informativa (>5%). Los resultados que obtuvimos mostraron valores de MAF superiores al 5% para cada SNP en ambas cohortes (Tabla 13).

Tabla 14: Frecuencias del alelo menor (MAF) del gen *VEGFA*. Análisis en pacientes con LLC y en la serie de individuos sanos. Análisis del equilibrio Hardy-Weinberg (HWE) en la serie control.

Locus	Alelos	Frecuencias Alélicas				HWE χ^2 p-valor
		LLC		Control		
		Alelo mayor	Alelo menor	Alelo mayor	Alelo menor	
rs699947	C:A	C: 0.55	A: 0.45	C: 0.60	A: 0.4	0.35
rs833061	T:C	T: 0.54	C: 0.46	T: 0.59	C: 0.41	0.4
rs2010963	G:C	G: 0.65	C: 0.35	G: 0.61	C: 0.39	0.69
rs25648	C:T	C: 0.85	T: 0.15	C: 0.86	T: 0.14	0.36
rs3025039	C:T	C: 0.87	T: 0.17	C: 0.88	T: 0.19	0.20

En la serie de individuos control, tres de los SNPs estudiados presentaron una elevada frecuencias alélica del alelo menor (rs699947, rs833061 y rs2010963), mientras que en los otros dos SNPs las frecuencias fueron mucho menores (rs25648 y rs3025039). A continuación, antes de realizar los estudios de asociación, evaluamos si los marcadores en la serie de estudio se encontraban en equilibrio HWE. Efectivamente, no se encontraron evidencias de una desviación. De esta manera, las proporciones de los genotipos para cada uno de los SNPs analizados se encontraban en equilibrio HWE ($p>0.05$).

4.1.4. Análisis de disequilibrio de ligamiento

Para determinar si los alelos de los SNPs analizados se transmiten como haplotipos, analizamos el efecto del disequilibrio de ligamiento entre los polimorfismos rs699947, rs833061, rs2010963, rs25648 y rs3025039 mediante el programa Haploview. Con este programa, calculamos los valores de LD, r^2 y LOD entre cada una de las variables (Tabla 14).

L1	L2	D'	LOD	r ²
1	2	0.98	164.26	0.938
1	3	0.95	53.41	0.387
1	4	0.98	30.16	0.232
1	5	0.006	0	0
2	3	0.963	57.59	0.41
2	4	1	31.9	0.233
2	5	0.041	0.02	0
3	4	1	13.51	0.103
3	5	0.127	0.33	0.004
4	5	0.462	0.57	0.005

Tabla 15: Valores de la medida de asociación normalizada del desequilibrio de ligamiento. Valores de D', r2 y LOD que miden el LD de cada variante mediante el programa Haploview.

Comparándolos dos a dos, detectamos elevados LDs entre rs699947 y rs833061 (D'= 0.98), rs833061 y rs2010963 (D'= 0.96), rs699947 y rs2010963 (D'= 0.95), y rs699947 y rs25648 (D'= 0.98). Sin embargo, comparando la variante rs3025039 con los otros polimorfismos rs699947 (D'= 0.1), rs833061 (D'= 0.4), rs2010963 (D'= 0.12) y rs25648 (D'= 0.46), obtuvimos una D' < 0,5 (Figura 9). Estos resultados indicaban un elevado LD entre 4 loci cercanos: rs699947, rs833061, rs2010963 y rs25648 (Tabla 14), lo que evidenciaba una segregación compartida entre ellos.

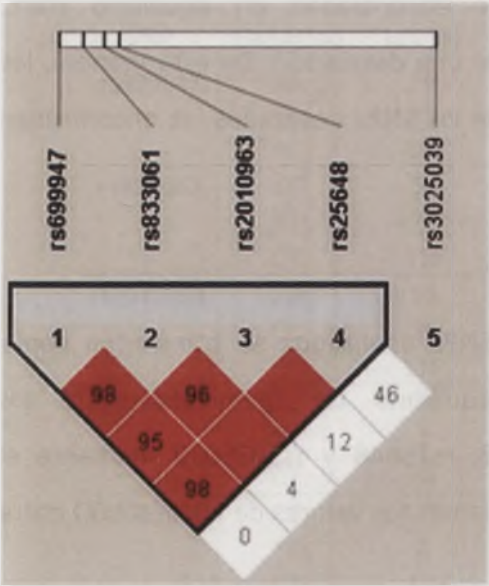


Figura 10: Gráfico del nivel de desequilibrio de ligamiento (LD) entre los polimorfismos del gen VEGFA obtenido mediante el programa Haploview. Los números en los bloques representan el valor decimal de D', que se muestra sólo cuando es inferior a 1 y no se muestra cuando es 1. El código de color de los bloques representa valores de D' y LOD. Color rojo (D' < 1, LOD ≥ 2) y blanco (D' = 1, LOD < 2).

4.1.5. Análisis de haplotipos

Con el fin de profundizar en el ligamiento detectado entre cuatro de las variantes polimórficas del gen *VEGFA*, realizamos un análisis haplotípico usando el programa PHASE, que permite la reconstrucción de haplotipos desde la información genotípica de las variantes. Con esta herramienta, se estimaron los haplotipos individuales y sus respectivas frecuencias haplotípicas para el grupo de pacientes y controles. En un primer análisis, identificamos diez haplotipos entre ambas cohortes, correspondientes a los loci rs699947, rs833061, rs2010963 y rs25648 (Tabla 15). Cuatro de ellos presentaron una elevada frecuencia haplotípica, mientras que los haplotipos ATGC, CCGC, CTGT, CTCT, ACCC y ATCC presentaron frecuencias inferiores al 5%, por lo que no fueron tomados en cuenta para los posteriores análisis, ya que sólo analizaremos los haplotipos considerados como comunes, con frecuencias superiores al 5%.

Análisis	Haplotipos	Frecuencias (%)	
		Control	LLC
1	ACGC	0.42	0.40
	ACGT	0.36	0.35
	CTCC	0.32	0.28
	CTGC	0.28	0.30
Haplotipos ATGC, CCGC, CTGT, CTCT, ACCC y ATCC con una frecuencia haplotípica <5%			
2	ACG	0.39	0.41
	CTC	0.38	0.36
	CTG	0.21	0.21
Haplotipos CCG, ACC, ATG, ATC y CCC con una frecuencia haplotípica <3%			

Tabla 16: Distribución de las frecuencias haplotípicas.
Análisis 1: rs699947, rs833061, rs2010963 y rs25648. Análisis 2: rs699947, rs833061 y rs25648

Para el análisis de la distribución de las frecuencias haplotípicas entre el grupo control y el grupo de pacientes, se empleó como referencia el haplotipo de mayor frecuencia de transmisión. No se obtuvieron diferencias estadísticamente significativas entre ambas series. En base a los anteriores resultados, decidimos realizar un estudio en mayor profundidad, estudiando los haplotipos definidos por los loci rs699947, rs833061 y rs2010963. En este análisis identificamos siete haplotipos con frecuencias

menores al 3% y tres grupos principales de haplotipos (Tabla 15). Las correspondientes frecuencias haplotípicas de la cohorte de individuos control y de pacientes fueron ACG (0,39 y 0,41), CTC (0,38 y 0,36) y CTG (0,21 y 0,21), respectivamente. Sin embargo, al analizar las frecuencias haplotípicas definidas por estas tres variantes polimórficas, tampoco detectamos diferencias significativas entre los pacientes con LLC y los individuos control.

4.1.6. Estudios de asociación entre los polimorfismos genéticos y las variables clínicas y moleculares

Seguidamente, analizamos si había alguna asociación entre los genotipos de ambas cohortes para cada uno de los SNPs del estudio (Tabla 16). En el estudio de asociación, se consideró cada polimorfismo como una variable categórica con diferentes genotipos posibles.

Tabla 17: Análisis de asociación en la distribución de las frecuencias alélicas y genotípicas en el grupo de pacientes y control.

SNP	Genotipo	Control		LLC		Control vs. LLC	OR	(IC 95)	p-valor
		n	%	n	%				
rs699947	AA	30	16.4	50	20.9				
	CC	67	36.6	77	32.2	AAvsCC	0.69	0.39 a 1.20	0.19
	AC	86	47.00	112	46.9	AAvsAC	0.78	0.45a 1.32	0.36
	CX (CC+AC)	153	83.6	189	79.1	AAvsCX	0.30	0.18 a 0.51	0.62
	AX (AA+AC)	116	63.4	162	67.8	CCvsAX	1.21	0.81 a 1.82	0.34
rs833061	CC	30	16.4	50	20.9				
	TT	63	34.4	73	30.5	CCvsTT	0.69	0.40 a 1.20	0.21
	CT	90	79.2	116	48.5	CCvsCT	0.77	0.45 a 1.31	0.34
	TX (TT+CT)	153	83.6	166	69.5	CCvsTX	0.65	0.43 a 1.10	0.09
	CX (CC+CT)	120	65.6	189	79.1	TTvsCX	0.94	0.56 a 1.62	0.82
rs2010963	GG	70	38.3	95	39.7				
	CC	29	15.8	26	10.9	GGvsCC	0.66	0.36 a 1.22	0.18
	GC	84	45.9	118	49.4	GGvsGC	1.03	0.68 a 1.57	0.87
	CX (CC+GC)	113	61.7	144	60.3	GGvsCX	0.93	0.63 a 1.39	0.75
	GX (GG+GC)	154	84.2	213	89.1	CCvsGX	1.02	0.70 a 1.47	0.92
rs25648	CC	137	74.9	168	70.3				
	TT	5	2.7	2	0.8	CCvsTT	0.33	0.06 a 1.71	0.18
	CT	41	22.4	69	28.9	CCvsCT	1.37	0.88 a 2.15	0.16
	TX (TT+CT)	46	25.1	71	29.7	CCvsTX	1.26	0.81 a 1.94	0.30
	CX(CC+CT)	178	97.3	237	99.2	TTvsCX	3.32	0.64 a 17.35	0.15
rs3025039	CC	146	79.78	178	74.5				
	TT	5	2.7	4	1.7	CCvsTT	1.46	0.17 a 2.48	0.53
	CT	32	17.5	57	23.8	CCvsCT	1.4	0.89 a 2.37	0.12
	TX (TT+CT)	37	20.2	61	25.5	CCvsTX	1.35	0.85 a 2.14	0.20
	CX (CC+CT)	151	82.5	221	92.5	TTvsCX	1.82	0.48 a 6.92	0.37

Primeramente, se consideró como categoría de referencia el grupo de individuos homocigotos para el alelo más frecuente. Posteriormente, debido a que el posible riesgo asociado para el genotipo de cada SNP también dependerá del número de copias de los alelos, estudiaremos tres modelos principales de herencia posibles: el modelo aditivo, dominante y recesivo. El grado de asociación se calculó mediante el valor de Odds ratios (OR) de cada genotipo respecto a la referencia. Como se detalla en la Tabla 20, no detectamos ninguna diferencia significativa entre ambas cohortes en el análisis.

En conjunto, en esta primera fase del estudio, todos los resultados obtenidos nos indicaban que en el análisis de los polimorfismos seleccionados del gen *VEGFA*, no detectábamos diferencias en las distribuciones alélicas, genotípicas y haplotípicas entre el grupo de pacientes y el grupo control. Por otra parte, para evaluar si existía alguna asociación con las diferentes variables clínicas y moleculares de los pacientes de LLC, estudiamos el tipo de interacción entre las mencionadas variables y los genotipos de cada uno de los SNPs, la distribución de los haplotipos formados por los loci rs699947/rs833061/rs2010963/rs25648 y rs699947/rs833061/rs2010963. Al igual que en los resultados anteriores, no detectamos diferencias significativas con respecto a los genotipos ni a los haplotipos ACGC, ACGT, CTCC y CTGC (información no mostrada). Sin embargo, a diferencia de los haplotipos CTC y CTG, detectamos que la distribución del haplotipo ACG en homocigosis ($ACG^{+/+}$), presentaba una frecuencia incrementada en los pacientes con IgVH-UM respecto a los pacientes con el estado IgVH-M. Estos resultados fueron estudiados en mayor profundidad, siendo expuestos en el Artículo I de la presente sección de resultados.

4.2. Análisis de las alteraciones moleculares de los genes *ATM*, *BIRC3*, *SF3B1* y *NOTCH1* en la supervivencia de pacientes con delección 11q

4.2.1. Determinación y distribución de las alteraciones moleculares

Para analizar el impacto de las mutaciones de los genes *ATM* y *BIRC3*, realizamos un cribado de las variantes moleculares mediante la técnica HRM, en muestras provenientes de 139 pacientes diagnosticados de LLC. Para el análisis del gen *ATM*, se amplificaron 62 regiones exónicas codificantes (exones del 2 al 63), que al no

presentar regiones con una mayor frecuencia de mutaciones, el cribado de las variantes fue realizado en toda la secuencia codificante. Sin embargo, para el gen *BIRC3* sólo se analizaron las regiones con una alta frecuencia mutacional o *hotspots*, que corresponden a 4 regiones exónicas (exones 6 al 9).

El procesamiento de los resultados mediante HRM nos permitió detectar que 157 muestras de pacientes con LLC, presentaron diferencias en su patrón de curvas de *melting* respecto al ADN *wild type*, durante la amplificación de los exones del gen *ATM* y *BIRC3*. Esto sugería que, potencialmente, dichas muestras podrían presentar una variación en sus secuencias génicas. De estas 157 muestras, 140 y 17 provenían de la amplificación de regiones exónicas del gen *ATM* y *BIRC3*, respectivamente. Para la verificación de estos resultados, realizamos la secuenciación de todas estas muestras. En el caso del gen *ATM*, confirmamos que 122 (87.1%) de las 140 muestras efectivamente presentaban una variante en sus secuencias de ADN, al igual que en 13 (86.7%) de las 15 muestras analizadas para el gen *BIRC3*. Por otro lado, 20 (12.9%) de las 155 muestras que habían sido detectadas como variantes por HRM, no fueron detectadas por secuenciación. Probablemente, estos resultados se obtienen como consecuencia de una mayor sensibilidad de detección de la técnica HRM.

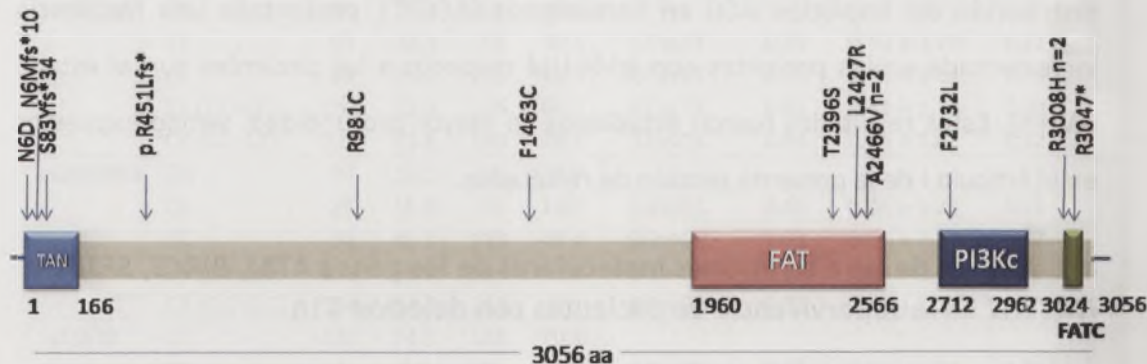


Figura 11: Representación esquemática de la proteína ATM y distribución de las mutaciones descritas en función de los dominios funcionales.

4.2.2. Análisis de patogenicidad de las variantes detectadas en los genes *ATM* y *BIRC3*

Para identificar el tipo de variación molecular que detectamos y confirmamos por secuenciación, las variantes fueron analizadas manualmente mediante diferentes bases de datos como *Human dbSNPS Database* del NCBI, *Ensembl Database*, *The Human Gene Mutation Database* (HGMD), *Catalogue of somatic mutations in cancer* (COSMIC) (Tabla 17). De forma paralela, las variantes moleculares fueron analizadas mediante un método de predicción de patogenicidad denominado *PolyPhen-2*, que predice si el cambio del aminoácido puede alterar sitios críticos en la función protéica. Por otra parte, para las variantes detectadas en las regiones intrónicas adyacentes a los exones, empleamos el programa *Human Splicing Finder* (HSF) que permite evaluar si la variante puede alterar regiones de *splicing*.

Las variantes también fueron contrastadas con datos de publicaciones recientes para comprobar si ya habían sido descritas previamente en neoplasias hematológicas u otros tipos de cáncer como mutaciones somáticas o germinales. Además, se analizaron los valores de MAF de cada variante, para diferenciar los polimorfismos comunes ($MAF > 0.01$) o variantes poco frecuentes ($MAF < 0.01$) de las mutaciones patogénicas.

En el caso del gen *ATM*, entre las variantes detectadas en las regiones exónicas, 7 fueron de tipo silente y 5 de tipo no sinónimo o *missense* (Tabla 18). En primer lugar analizamos las variantes *missense* que no han sido descritas como mutaciones. De las 5 variantes, 3 presentaron $MAF < 0.01$, sin embargo, no se han descrito en asociación con ningún tipo de cáncer y por Polyphen el cambio es de tipo benigno. Por tanto, las hemos clasificado como polimorfismos genéticos. En las dos variantes restantes, rs2234997 y rs1801516, presentaban $MAF > 0.01$. Por otro lado, de las 8 variantes intrónicas identificadas, 5 presentaron $MAF < 0.01$ y una variante no había sido descrita previamente. Sin embargo todas fueron localizadas fuera de las regiones de *splicing* de interés, y no han sido descritas en asociación con ningún tipo de cáncer.

Tabla 18: Polimorfismos detectados mediante HRM y validados por secuenciación en regiones codificantes del gen ATM.

Exón	SNP	Pacientes	Nº muestra	Cambio	Tipo de cambio	Codón	Posición proteína	Posición ARNm	MAF	Polyphen (Predicción)
3	rs3218690	10088	1	c.162T > C	Silente	TAT → TAC	p.Tyr54Tyr	547	C=0.001	
5	rs2234997	2298, 1796	2	c.378 T > A	Missense	GAT → GAA	p.Asp126Glu	763	A=0.05	Benigno
6	No descrito	14033	1	c.648 A > T	Silente	GCT → GCA	p.Ala216Ala	1031	Sin dato	
6	rs144709948	161, 9477	2	c.609 C > T	Silente	GAC → GAT	p.Asp203Asp	994	T=0.001	
7	rs3218674	3068, 3650	2	c.735 C > T	Silente	GTC → GTT	p.Val245Val	1120	T=0.0036	
9	rs1800727	1796	1	c.1176 C>G	Silente	GGC → GGG	p.Gly392Gly	1561	G=0.015	
10	rs4987943	1766, 7971	2	c.1254 A > G	Silente	CAA → CAG	p.Gln418Gln	1639	G=0.026	
11	rs2235006	1369, 8922	2	c.1744 T > C	Missense	TTC → CTC	p.Phe582Leu	2129	C=0.002	Benigno
13	rs201762714	T: 13193	1	C.2021 A > G	Missense	CAC → CGC	p.His674Arg	2406	G=0.0002	Benigno
30	rs1800889	NT: 2301,6008, 5462,5145,14372, 2301 T: 2915, 15460	8	c.4578 C>T	Silente	CCC → CCT	p.Pro1526Pro	4963	T=0.01	
37	rs1801516	NT: 164, 4891, 8788, 5462, 11305, 7387, 9241, 6708, 8417, 14328, 9810, 9635, 9422, 13848, 14012, 404, 4731, 5368, 11233, 5304, 2298, 14873, 13526,13577 T: 7049, 699,3945,4231	28	c.5557 G>A	Missense	GAT → AAT	p.Asp1853Asn	5942	A=0.06	Benigno
43	rs1800060	7207	1	c.6235 G>A	Missense	GTC→ ATC	p.Val2079Ile	2260	A=0.0028	Benigno

Abreviaciones: NT, no tratado; T, tratado

Tabla 19: Polimorfismos detectados mediante HRM y validados por secuenciación, correspondientes a regiones intrónicas del gen *ATM*.

SNP	Muestras	Nº muestras	Cambio	MAF
rs3218681	NT: 6008, 2143, 97, 6393, 9422; T: 2915, 2143, 508, 97, 432	8	c.3403-15_3403-14insTA	0.43
rs3092840	7115	1	c.3729-34A>G	G=0.004
No descrito	NT: 2301, 9501, 3739, T: 508	4	c.4109+14A>G	
rs3092828	7950	1	c.5497-15G>C	C=0.002
rs3092829	5462, 11305, 9810, 9635, 8417, 9422, 14012, 5368, 9635, 14873	10	c.5497-8T>C	C=0.013
rs3218686	14443	1	c.5762+27G>A	A=0.001
rs17107917	NT: 9515, 14910, 9624 T: 5175	4	c.6199-61C>G	G=0.014
rs664143	NT: 4731, 4232, 4891, 14033, 5304, 9810, 5462, 10257, 6842, 6137, 8885, 13577, 9635, 11763, 9628, 14301, 11305, 14328, 13526, 13083, 61 T: 3393, 3945, 14119	24	c.8850+60A>G	A=0.37

Abreviaciones: NT, no tratado; T, tratado.

Las variables que clasificamos como patogénicas para el gen *ATM*, se describen en la Tabla suplementaria II (Artículo II). En relación al análisis del gen *ATM*, clasificamos como mutaciones a 15 variantes en 14/118(11.8%) pacientes recién diagnosticados y 4 en 4/27 (14.8%) pacientes previamente tratados. En el caso de los pacientes al diagnóstico, 5 variantes no habían sido descritas previamente y 4 de ellas las identificamos como mutaciones de origen somático. La variante restante (p.F2732L) fue considerada patogénica al ser detectada sólo en un paciente y presentar un daño potencial en el dominio catalítico de la proteína ATM (PIKKc) mediante Polyphen. Las otras variantes fueron descritas como mutaciones en diferentes tipos de cáncer en otras publicaciones. Concretamente, p.R981C detectada en cáncer de ovario y mama (HBOC) [366], p.F1463C (no detectada en 140 individuos sanos) [367] y p.A2466V detectadas en cáncer de mama [368], p.T2396S en leucemia pro-linfocítica de células T (T-PLL) [369], p.L2427R en Ataxia-telangiectasia (AT) [370], p.R3008H en LLC [371] fue detectada como somática en la muestra y finalmente p.R3047* en linfoma de células del manto (MCL) [372].

En cuanto al gen *BIRC3*, detectamos 5 muestras de pacientes con variantes polimórficas (Tabla 19) De ellas, tres se detectaron en regiones exónicas y una de ellas no había sido descrita previamente. Sin embargo, todas fueron descritas como benignas en la predicción de Polyphen. Sólo detectamos una variante en la región intrónica, no descrita con anterioridad pero sin ningún efecto en la zona de *splicing* según la predicción de *Human Splicing Finder*.

Tabla 20: Variantes polimórficas de las regiones exónicas e intrónicas del gen *BIRC3*.

Exón	SNP	Pacientes	Nº Muestra	Cambio	Tipo de cambio	Codón	Posición proteína	Posición ARNr	MAF	Polyphen (Predicción)
E6	rs12222256	9624	1	c.1156 G>A	Missense	GTG→ATG	p.Val386Met	1391	A=0.0028	Benigno
E6	rs17881197	7387	1	c.1202 G>A	Missense	AGA→AAA	p.Arg404Lys	1437	A=0.004	Benigno
E8	No descrita	3739 14012	2	c.1592 T>G	Missense	ATA→AGA	p.Ile531Arg	4387	Sin dato	Benigno

SNP (Intrón)	Pacientes	Nº Muestra	Cambio	MAF
No descrito	618	1	c.*6 A>T	Sin dato

Las variantes del gen *BIRC3* descritas como patogénicas se describen en la Tabla suplementaria II (Artículo II). Se detectaron 5 variantes en 7/1185.9%) pacientes recién diagnosticados. No se detectaron mutaciones de *BIRC3* en pacientes tratados. Tres variantes no se habían descrito con anterioridad en ningún estudio. Una de ellas, p.L500 IVS7 -1 G-C fue una variante intrónica que según la predicción de *Human Splicing Finder* podría alterar regiones de *splicing* críticas en la funcionalidad de la proteína. La variante p.R428fs*19 fue descrita en LLC [72] y p.C560S en MCL [373].

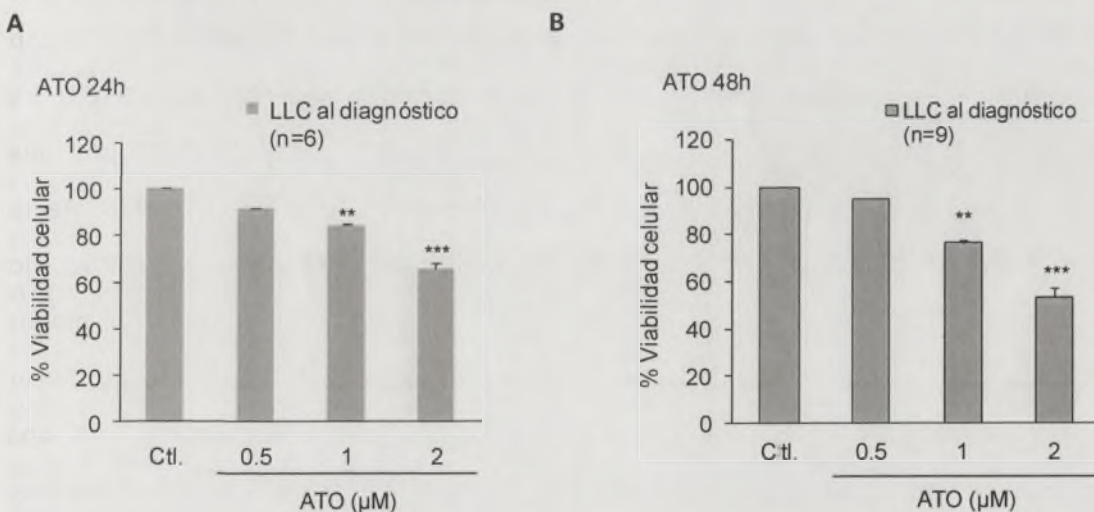
4.3. Estudio del efecto citotóxico de combinaciones de fármacos y su correlación con alteraciones moleculares de pronóstico adverso

4.3.1. Análisis del efecto de la combinación de ATO y Forodesina con dGuO en pacientes al diagnóstico y en progresión

4.3.1.1. Análisis de la citotoxicidad de los fármacos individuales ATO y Forodesina

Con el fin de evaluar el efecto citotóxico de ATO en combinación con Forodesina, primeramente establecimos la concentración óptima de trabajo, analizando el efecto de los fármacos individuales a diferentes concentraciones y tiempos de cultivo. La viabilidad celular de las muestras se cuantificaron por citometría

de flujo mediante el marcaje con Anexina V-FITC/IP y para el análisis fueron normalizando todos los resultados obtenidos a 100. En el análisis de Forodesina con dGuO, se cultivaron 2×10^5 células de LLC provenientes de pacientes al diagnóstico ($n=3$) y con tratamiento previo ($n=3$) durante 24 y 48 horas, a una concentración constante de Forodesina $2 \mu\text{M}$ con concentraciones crecientes de dGuO a 10, 20 y $30 \mu\text{M}$. La viabilidad constitutiva media fue del 88% en las muestras de pacientes al diagnóstico y del 86 % en pacientes con tratamiento previo. A 48 horas, detectamos un mayor efecto citotóxico en el cultivo celular proveniente de las muestras de los pacientes recién diagnosticados, con una disminución de la viabilidad celular a un 78%, 62% y 63% (SD: 8.5, 2.3 y 2.9), correspondientes a las concentraciones de dGuO anteriormente mencionadas. Finalmente, la concentración de Forodesina que seleccionamos para experimentos posteriores fue de $2 \mu\text{M}$ con dGuO $20 \mu\text{M}$, al tener un mejor efecto citotóxico (38% de apoptosis) en la viabilidad celular con respecto a dGuO $10 \mu\text{M}$ (22% de apoptosis) y un efecto similar al obtenido con $30 \mu\text{M}$ de dGuO. En cuanto a ATO, cultivamos 2×10^5 células de LLC provenientes de ambas cohortes de estudio, en concentraciones crecientes de ATO a 0.5, 1 y $2 \mu\text{M}$ a 24 y 48 horas de cultivo. La viabilidad constitutiva media fue del 89%, para las muestras celulares de los pacientes recién diagnosticados ($n=6$) y del 87% para los pacientes en progresión ($n=6$). Como se muestra en la Figura 9 A y B, a 24 horas de cultivo la viabilidad celular disminuye de forma dosis dependiente pero reducida, para ATO $0.5 \mu\text{M}$ (8.4% y 6.1% de apoptosis), $1 \mu\text{M}$ (16.3% y 14.6%) y $2 \mu\text{M}$ (34.6% y 23.2%), en los pacientes recién diagnosticados y en progresión, respectivamente.



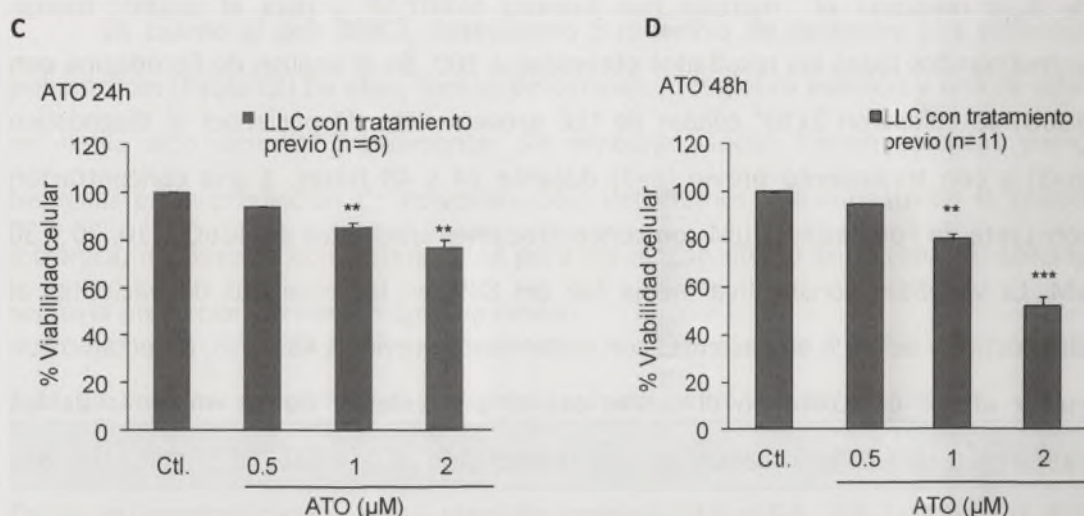


Figura 12: Efecto apoptótico inducido por concentraciones crecientes de ATO en células de LLC durante 24 y 48 horas. A y C, Muestras de pacientes al diagnóstico sin tratamiento; B y D, muestras de pacientes que han recibido tratamiento previo al análisis. Se muestran los % de viabilidad celular determinados por citometría de flujo usando el marcaje de Anexina V-FITC/IP. Los datos obtenidos fueron comparados con el control (Ctl), células de pacientes cultivadas sólo con medio. Todos los datos están normalizados a 100. *, $p \leq 0.05$, **, $p \leq 0.01$, *** $p \leq 0.001$.

Por otro lado, al aumentar el tiempo de cultivo a 48 horas (Figura XX A, B), obtuvimos un mayor efecto apoptótico con las dosis de ATO a 1 μM (24% y 21%) y a 2 μM (46.6% y 47.8%), en las células de los pacientes al diagnóstico ($n=9$) y en los pacientes en progresión ($n=9$), con una viabilidad constitutiva promedio para ambas cohortes del 85% y del 86%, respectivamente.

4.3.1.2. Efecto citotóxico de ATO en combinación con Forodesina

Para determinar posibles efectos sinérgicos entre la interacción de ATO con Forodesina, realizamos combinaciones de concentraciones crecientes de ATO (0.5, 1 y 2 μM) con una concentración constante de Forodesina 2 μM y dGuO 20 μM , que anteriormente determinamos. Como era de esperar al observar un menor efecto citotóxico de ATO y Forodesina de forma individual a 24 horas de cultivo, no detectamos diferencias estadísticamente significativas en la combinación de ambos fármacos en las células de los pacientes al diagnóstico, y sólo detectamos un mayor efecto apoptótico en la combinación de ATO 0.5 μM y Forodesina, con una disminución de la viabilidad celular a un 81% frente a un 93% y 88% de sus respectivos fármacos individuales, ATO y Forodesina, respectivamente (Figura 10 A,B).

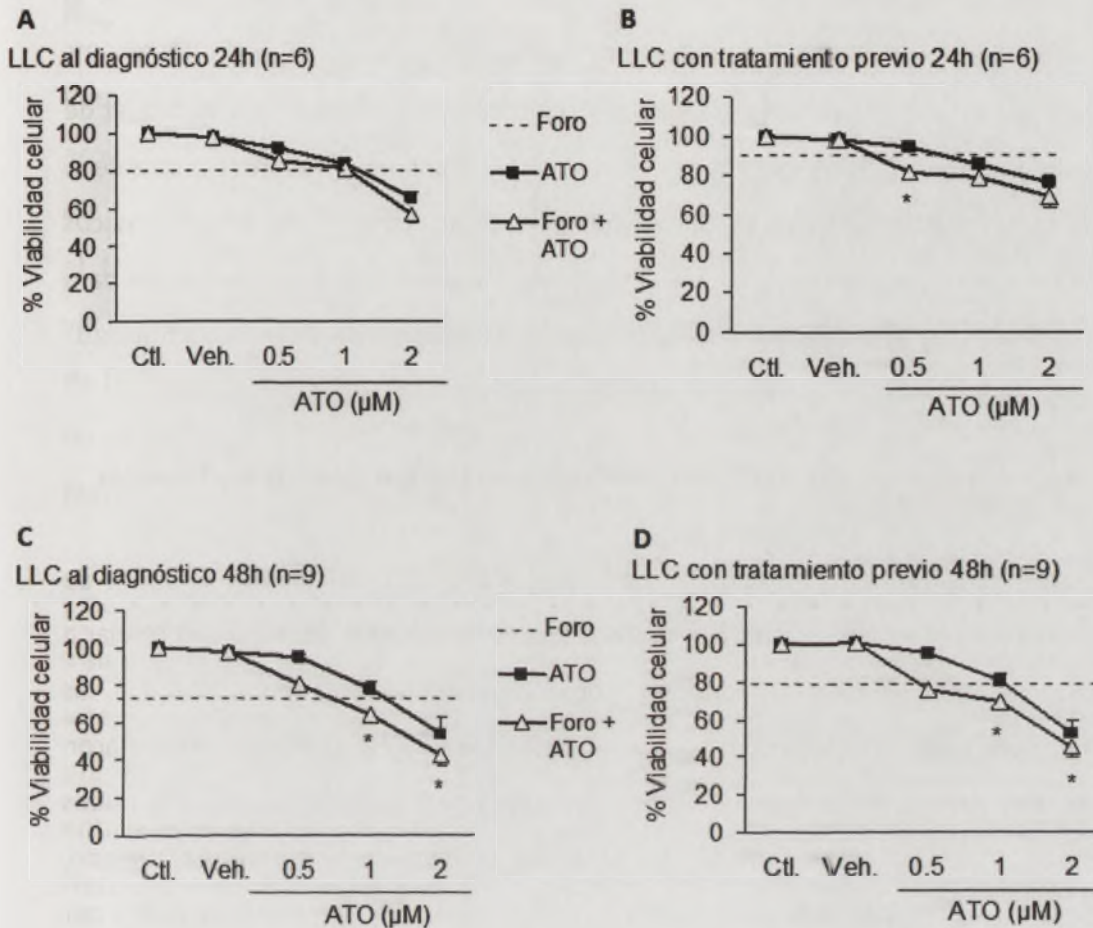


Figura 13: Incremento citotóxico por la combinación de Forodesina (Foro) y ATO a 24 horas de cultivo de células de LLC. A y B, Muestras de pacientes al diagnóstico y con tratamiento previo, respectivamente. Las células fueron incubadas con medio (Ctl, control), vehículo (Veh) y tratadas con ATO en concentraciones crecientes, Forodesina 2 μM con 20 μM de dGuO y con la combinación de ambos fármacos (Foro y ATO). Los datos fueron normalizados a 100. *, $p \leq 0.05$.

Sin embargo, a las 48 horas de cultivo observamos un mayor efecto apoptótico para las combinaciones con ATO 0.5 y 1 μM, en ambas cohortes. En la viabilidad celular de los cultivos celulares incubados con Forodesina, no detectamos diferencias entre los pacientes al diagnóstico (76.8%) y los pacientes en progresión (80.5%). En el caso de ATO, el decrecimiento de la viabilidad celular, siguió una respuesta dosis dependiente en los pacientes al diagnóstico (ATO: 0.5, 1 y 2 μM: 95.1%, 76.2% y 53.4%) y en los pacientes en progresión (94.8%, 80%, 52.2%), sin diferencias significativas entre ambas cohortes ($p=0.97$). Sin embargo, en la combinación de Forodesina 2 μM/dGuO 20 μM con ATO, la viabilidad celular disminuyó de forma moderada pero significativa, en las

combinaciones con ATO 1 y 2 μ M para los cultivos celulares de los pacientes al diagnóstico (80.6%, 64.3% y 42%) y de los pacientes con tratamiento previo (76%, 69% y 45%) (Figura 11, C,D). De esta manera, seleccionamos el tiempo de cultivo celular de 48 horas para los análisis posteriores. Aunque detectamos un ligero incremento de la apoptosis en la combinación de Forodesina y ATO en comparación a los fármacos individuales, es necesario estudiar en mayor profundidad este tipo de interacción para determinar si la respuesta observada corresponde a un patrón de sinergia o aditividad.

4.3.1.3. Determinación del índice de combinación en la interacción de los fármacos

Para analizar la interacción entre Forodesina y ATO, calculamos el índice de combinación mediante el programa Compusyn, para los ensayos de viabilidad celular a 48 horas de cultivo en ambas cohortes. Como se observa en la Figura 11 A y B, las combinaciones de ATO y Forodesina para todas las dosis estudiadas, presentaron índices de combinación que indicaban interacciones aditivas. Estos resultados muestran que la combinación de ambos fármacos en las dosis que hemos estudiado, muestran una actividad que en conjunto es similar a la suma de sus actividades por separado, sin embargo la respuesta conjunta no fue superior, por lo que no detectamos que la combinación sea sinérgica.

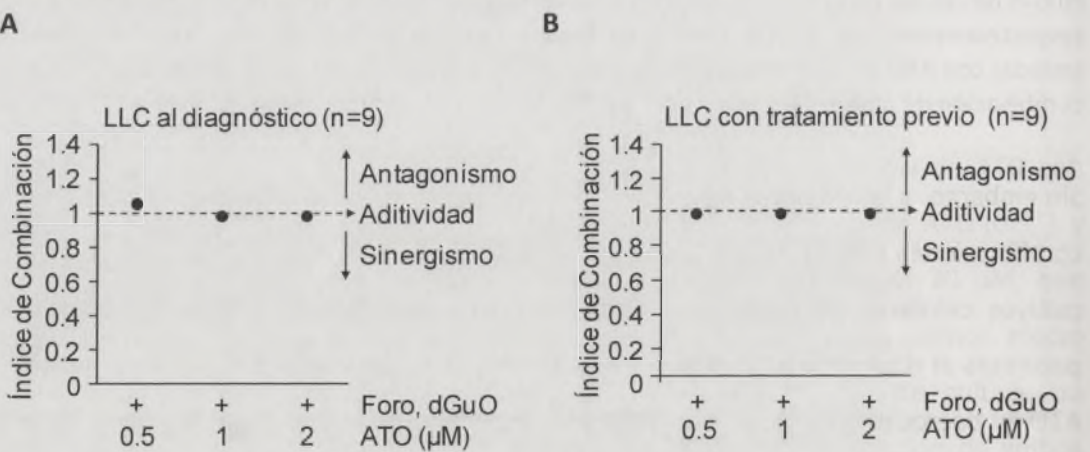


Figura 14: Representación gráfica de los índices de combinación a 48 horas de cultivo. A y B, Muestras de pacientes recién diagnosticados y con tratamiento previo, respectivamente. Índices de combinación en respuesta al efecto citotóxico de la combinación de Foro con dGuO y ATO, en cultivos de células de pacientes con LLC. Datos calculados mediante el programa Calcsyn.

4.3.2. Correlación de las alteraciones moleculares de pronóstico adverso con la respuesta al efecto citotóxico de forodesina y fludarabina en combinación con ATO

Para estudiar si el efecto citotóxico inducido por las combinaciones de fármacos se asocia con características moleculares de los pacientes, analizamos los datos obtenidos de viabilidad celular, para identificar si hay pacientes con respuestas menos eficientes al tratamiento *in vitro*. El análisis lo realizamos evaluando la disminución de la viabilidad celular en respuesta a los fármacos, en el tratamiento con ATO y Forodesina de forma individual, así como en su combinación. Entre los pacientes de cada cohorte, no detectamos diferencias significativas que permitan la identificación de respuestas menos eficientes frente a los fármacos.

Esto parece indicar que las diferentes alteraciones moleculares entre los pacientes con y sin tratamiento previo, no cambian la eficacia frente a los fármacos, ni modifican la interacción aditiva entre Forodesina y ATO. Por otro lado, en los resultados presentados en el Artículo III de la tesis, donde analizamos la interacción sinérgica entre ATO y fludarabina, si observamos una menor eficiencia en cuanto a la respuesta frente a fludarabina para ambas cohortes de estudio. De esta manera, agrupamos las características moleculares adversas en función del tipo respuesta al tratamiento con fludarabina, como sensible o resistente, como se observa en la Tabla 20.

Tabla 21: Características clínicas y moleculares de los pacientes con LLC al diagnóstico y con tratamiento previo en función de la resistencia o sensibilidad a fludarabina. Pacientes P3, P5, P9, P10, P11, P23, P26, P27, P29 y P31 no respondieron a fludarabina en los ensayos *in vitro* a 48 horas de cultivo. Pacientes de LLC al diagnóstico

Código	Género	Binet/Rai	CD38/ZAP70	TP53 (mut/del)	ATMmut	BIRC3mut	SF3B1mut	NOTCH1mut	Delección 11q	IgVH	Tratamiento
P3	M/67	B/I	Neg/Pos	WT/del	UM	M	UM	UM	del	UM	No
P5	M/54	A/I	Neg/Pos	ND/del	UM	UM	UM	UM	del	M	No
P9	M/58	A/I	Neg/Pos	ND/del	UM	UM	UM	UM	del+	UM	No
P10	M/74	A/O	Pos/Pos	ND/del	UM	UM	UM	UM	del	M	No
P11	F/42	B/I	Neg/Pos	WT/del	UM	UM	UM	UM	del	M	No
P1	M/57	A/O	Neg/ND	ND/del	UM	UM	UM	UM	del	M	No
P2	F/54	A/O	Neg/ND	WT/del	UM	UM	UM	UM	del	M	No
P4	M/67	A/O	Pos/Pos	WT/del	UM	UM	UM	UM	del	UM	No
P6	M/43	B/I	Neg/Pos	WT/del	UM	UM	UM	UM	del	UM	No
P7	F/53	A/O	Neg/Pos	WT/del	UM	UM	UM	UM	del	UM	No
P8	F/52	A/O	ND/ND	ND/del	UM	UM	UM	UM	del	M	No
P12	F/59	A/O	Neg/Pos	WT/del	M	UM	UM	UM	del	M	No
P13	M/73	A/O	Neg/Pos	M/del	M	UM	UM	UM	del	UM	No
P14	M/57	B/I	Neg/Pos	WT/del	UM	UM	UM	UM	del	UM	No
P15	M/64	B/I	Neg/ND	M/del	ND	ND	UM	UM	del	UM	No
P16	F/55	B/I	Neg/Pos	M/del	ND	ND	UM	UM	del	M	No
P17	M/47	A/O	Neg/Neg	WT/del	ND	ND	UM	UM	del	ND	No
P18	M/75	A/I	Neg/Neg	ND/del	ND	ND	UM	UM	del	ND	No
P19	F/72	A/O	Neg/Pos	WT/del	UM	UM	UM	UM	del	M	No
P20	F/69	B/I	Neg/Pos	ND/del	ND	ND	UM	UM	del+	ND	No
P21	M/65	A/I	Neg/ND	ND/del	ND	ND	ND	ND	del	ND	No

Pacientes de LLC con tratamiento previo

Código	Género	Binet/Rai	CD38/ZAP70	TP53 (mut/del)	ATMmut	BIRC3mut	SF3B1mut	NOTCH1mut	Delección 11q	IgVH	Tratamiento
P23	M/44	B/I	Pos/Pos	M*/del	UM	UM	UM	UM	del	UM	Fludarabina
P26	F/65	A/I	Neg/Neg	M/del	UM	UM	M	UM	del	M	Bendamustina
P27	M/50	A/O	Neg/Pos	ND/del	UM	UM	UM	UM	del	M	FCR+Rm
P29	F/53	A/O	Neg/ND	M*/del	UM	UM	M	UM	del	UM	FC
P31	M/49	A/I	Pos/Pos	WT/del	M	UM	UM	M	del+	UM	Clorambucilo
P22	F/72	A/O	Neg/Pos	WT/del	UM	UM	UM	UM	del	M	Clorambucilo
P24	F/68	A/O	Neg/Pos	WT/del	UM	UM	UM	UM	del	UM	Clorambucilo
P25	F/67	A/I	Pos/ND	WT/del	UM	UM	UM	UM	del	UM	FC
P28	M/68	A/O	Neg/Neg	WT/del	UM	UM	M	ND	del	M	FC
P30	M/46	A/O	Pos/Pos	WT/del	UM	UM	UM	M	del	UM	FC
P32	M/46	A/I	Pos/Pos	WT/del	M	UM	UM	M	del	M	FC-Alentuzumab
P33	M/64	B/I	Neg/ND	WT/del	M	M	UM	UM	del+	UM	FC
P34	M/69	B/I	Neg/Pos	ND/del	UM	UM	UM	UM	del+	UM	FCR
P35	M/65	A/O	Pos/Neg	WT/del	ND	ND	UM	UM	del	UM	Fludarabina

Abreviaciones: M, mutado; UM, no mutado; WT, wild type; ND, sin dato; M*, mutación adquirida; Pos, expresión positiva; Neg, expresión negativa; FDR, Fludarabina + ciclofosfamida + Rituximab; Rm; mantenimiento con Rituximab; FC, Fludarabina + Ciclofosfamida.

4.4. Artículos

Artículo I: Vascular Endothelial Growth Factor A (VEGFA) Gene Polymorphisms Have an Impact on Survival in a Subgroup of Indolent Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia.

El factor de crecimiento vascular endotelial (*VEGFA*) es un factor proangiogénico con múltiples funciones en la formación tumoral, implicado en la patogénesis de varios desórdenes hematológicos, incluida la LLC. En este artículo se investiga el impacto pronóstico de cinco variantes polimórficas del gen *VEGFA*: rs699947 (-1540 C>A), rs833061 (-460T>C), rs2010963 (405C>G), rs25648 (1032C>T) y rs3025039 (1689C>T) en 239 pacientes con LLC al diagnóstico.

El análisis de las frecuencias haplotípicas identificó al haplotipo ACG en homocigosis (genotipo $ACG^{+/+}$) conformado por las variantes rs699947/rs833061/rs2010963, asociado a una menor supervivencia en pacientes de LLC, respecto a otros genotipos ($ACG^{+/+}$ vs otros genotipos: HR = 2.3, p = 0.002). En el análisis multivariante, el genotipo $ACG^{+/+}$ fue identificado como un nuevo factor pronóstico independiente (HR: 2.1, p=0.05). Además, subdividió a los pacientes de LLC con parámetros indolentes en subgrupos con diferente pronóstico. Concretamente, pacientes con genes IgVH-M, con una genética de bajo riesgo (trisomía 12, cariotipo normal) o muy bajo riesgo (deleción 13q de forma aislada), en estadios clínicos iniciales, expresión negativa de CD38 y con una edad al diagnóstico inferior a 65 años, presentaron una disminución de la SG asociada a la presencia del genotipo $ACG^{+/+}$.

En conclusion, el genotipo $ACG^{+/+}$ confiere un efecto adverso en la supervivencia de pacientes con LLC de características indolentes. Estos resultados apoyan el uso potencial de determinadas variantes genéticas de *VEGFA* en la LLC.

Article

Reaction of Methyl Methacrylate with AIBN in the Presence of a Radical Scavenger

The reaction of methyl methacrylate (MMA) with azobisisobutyronitrile (AIBN) in the presence of a radical scavenger, 2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl (TEMPO), was studied. The reaction was monitored by ¹H NMR spectroscopy. The reaction was found to be first order in AIBN and first order in MMA. The reaction was also found to be first order in TEMPO. The reaction was found to be independent of the concentration of the radical scavenger.

Keywords: methyl methacrylate; azobisisobutyronitrile; 2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl; radical scavenger; ¹H NMR spectroscopy

The reaction of methyl methacrylate (MMA) with azobisisobutyronitrile (AIBN) in the presence of a radical scavenger, 2,2,6,6-tetramethylpiperidine-1-oxyl (TEMPO), was studied.

The reaction was monitored by ¹H NMR spectroscopy. The reaction was found to be first order in AIBN and first order in MMA.

The reaction was also found to be first order in TEMPO. The reaction was found to be independent of the concentration of the radical scavenger.

The reaction was found to be independent of the concentration of the radical scavenger. The reaction was found to be independent of the concentration of the radical scavenger.

The reaction was found to be independent of the concentration of the radical scavenger. The reaction was found to be independent of the concentration of the radical scavenger.

The reaction was found to be independent of the concentration of the radical scavenger. The reaction was found to be independent of the concentration of the radical scavenger.

The reaction was found to be independent of the concentration of the radical scavenger. The reaction was found to be independent of the concentration of the radical scavenger.

The reaction was found to be independent of the concentration of the radical scavenger. The reaction was found to be independent of the concentration of the radical scavenger.

The reaction was found to be independent of the concentration of the radical scavenger. The reaction was found to be independent of the concentration of the radical scavenger.

The reaction was found to be independent of the concentration of the radical scavenger. The reaction was found to be independent of the concentration of the radical scavenger.

The reaction was found to be independent of the concentration of the radical scavenger. The reaction was found to be independent of the concentration of the radical scavenger.

The reaction was found to be independent of the concentration of the radical scavenger. The reaction was found to be independent of the concentration of the radical scavenger.

The reaction was found to be independent of the concentration of the radical scavenger. The reaction was found to be independent of the concentration of the radical scavenger.

The reaction was found to be independent of the concentration of the radical scavenger. The reaction was found to be independent of the concentration of the radical scavenger.

The reaction was found to be independent of the concentration of the radical scavenger. The reaction was found to be independent of the concentration of the radical scavenger.

The reaction was found to be independent of the concentration of the radical scavenger. The reaction was found to be independent of the concentration of the radical scavenger.

The reaction was found to be independent of the concentration of the radical scavenger. The reaction was found to be independent of the concentration of the radical scavenger.



Vascular Endothelial Growth Factor A (VEGFA) Gene Polymorphisms Have an Impact on Survival in a Subgroup of Indolent Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia

Carol Lozano-Santos¹, Jimena Martinez-Velasquez³, Belen Fernandez-Cuevas¹, Natividad Polo¹, Belen Navarro¹, Isabel Millan², Jose Miguel Garcia⁴, Rosa Collado⁵, Pedro Sanchez-Godoy⁶, Felix Carbonell⁵, Jose Antonio Garcia-Vela⁷, Jose Antonio Garcia-Marco^{1*}, Natalia Gomez-Lozano^{3,8}

1 Department of Hematology, Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda & Instituto de Investigación Puerta de Hierro Majadahonda (IDIPHIM), Madrid, Spain, **2** Department of Statistics, Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda & Instituto de Investigación Puerta de Hierro Majadahonda (IDIPHIM), Madrid, Spain, **3** Group of Immunogenetics, Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda & Instituto de Investigación Puerta de Hierro Majadahonda (IDIPHIM), Madrid, Spain, **4** Group of Oncology, Hospital Universitario Puerta de Hierro Majadahonda & Instituto de Investigación Puerta de Hierro Majadahonda (IDIPHIM), Madrid, Spain, **5** Department of Hematology, Consorcio Hospital General Universitario de Valencia, Valencia, Spain, **6** Department of Hematology, Hospital Severo Ochoa de Madrid, Madrid, Spain, **7** Department of Hematology, Hospital Universitario Ramón y Cajal de Madrid, Madrid, Spain

Abstract

Vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis contributes to the pathogenesis of B-cell chronic lymphocytic leukaemia (CLL). We investigated the impact of VEGFA gene diversity on the clinical outcome of patients with this disease. A VEGFA haplotype conformed by positions rs699947 (−1540C>A), rs833061 (−460T>C) and rs2010963 (405C>G) and two additional single-nucleotide polymorphisms (SNPs), rs3025039 (936C>T) and rs25648 (1032C>T), were analysed in 239 patients at the time of their CLL diagnosis. Here, we showed that homozygosity for rs699947/rs833061/rs2010963 ACG haplotype (ACG^{+/+} genotype) correlated with a reduced survival in CLL patients (ACG^{+/+} vs other genotypes: HR = 2.3, $p = 0.002$; recessive model). In multivariate analysis, the ACG^{+/+} genotype was identified as a novel independent prognostic factor (HR = 2.1, $p = 0.005$). Moreover, ACG homozygosity subdivided patients with CLL with otherwise indolent parameters into prognostic subgroups with different outcomes. Specifically, patients carrying the ACG^{+/+} genotype with mutated *IgV_H*, very low and low-risk cytogenetics, initial clinical stage, CD38 negative status or early age at diagnosis showed a shorter survival (ACG^{+/+} vs other genotypes: HR = 3.5, $p = 0.035$; HR = 3.4, $p = 0.001$; HR = 2.2, $p = 0.035$; HR = 3.4, $p = 0.0001$ and HR = 3.1, $p = 0.009$, respectively). In conclusion, VEGFA ACG^{+/+} genotype confers an adverse effect in overall survival in CLL patients with an indolent course of the disease. These observations support the biological and prognostic implications of VEGFA genetics in CLL.

Citation: Lozano-Santos C, Martinez-Velasquez J, Fernandez-Cuevas B, Polo N, Navarro B, et al. (2014) Vascular Endothelial Growth Factor A (VEGFA) Gene Polymorphisms Have an Impact on Survival in a Subgroup of Indolent Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia. PLoS ONE 9(6): e101063. doi:10.1371/journal.pone.0101063

Editor: Masaru Katoh, National Cancer Center, Japan

Received: February 8, 2014; **Accepted:** June 3, 2014; **Published:** June 27, 2014

Copyright: © 2014 Lozano-Santos et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: This work was supported by Fundación para la Investigación Biomédica and Fondo de Investigación Sanitaria (FIS CP09-182), Instituto de Salud Carlos III. The authors were funded by the following institutions: NGL by a grant from programa Miguel Servet, Fondo de Investigación Sanitaria, Instituto de Salud Carlos III; CLS by a research grant from Roche Pharma and JMV by Fundación para la Investigación Biomédica Puerta de Hierro. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: CLS received funding from Roche Farma for this work and has no other relationships, conditions or circumstances that present potential competing interests related with this work. This does not alter the authors' adherence to PLOS ONE policies on sharing data and materials. The rest of the authors declare no competing interests related with this work.

* Email: ngomez@idiphim.org

These authors contributed equally to this work.

Introduction

A significant variability in the clinical course of B-cell chronic lymphocytic leukemia (CLL) exists as a result of multiple different pathogenic mechanisms. B cell receptor repertoire skewing and stereotypy and differences in the mutational status of the *IgV_H* gene demonstrate an antigen-driven process. Multiple genetic lesions associated with CLL (*del13q14*, trisomy 12, *TP53* deletion, *ATM* deletion, *NOTCH1* and *SF3B1* mutations and others) contribute to the initiation and progression of this leukemia. Recently, there has

been a growing interest in determining the impact of microenvironmental interactions, such as angiogenesis, in the pathogenesis and progression of CLL.

Vascular endothelial growth factor (VEGF) is a pro-angiogenic factor with multiple roles in tumour formation that is involved in the pathophysiology of many hematologic disorders, including CLL. Several reports have shown an enhanced microvessel density in the bone marrow and lymph nodes in patients with CLL, as a result of a VEGF-dependent angiogenesis associated with an advanced stage of disease [1–3]. Furthermore, it has also been

reported that the resistance to apoptosis of leukemic cells in CLL is mediated by VEGF-dependent autocrine and paracrine mechanisms of cell survival [4–7]. In addition to the angiogenic and antiapoptotic effects on CLL cells, VEGF regulates CLL cell motility [8,9] and the microenvironment-tumor interactions [10,11].

Considerable variation in VEGF expression exists among individuals. However, elevated VEGF levels in the serum or plasma of CLL patients positively correlate with disease progression [12] and such patients are more likely to progress rapidly to a more advanced stage of disease [13]. In addition, high levels of expression of one of its receptors, VEGFR2, correlate with shortened survival [14].

VEGFA is a gene comprised of eight coding exons and several alternative spliced forms that maps to chromosome region 6p1.2. Genetic polymorphisms have been identified outside of the coding region in the 5' and 3' flanking regions, and these polymorphisms seem to have an influence on gene expression. SNPs rs699947 (–1540C>A) and rs833061 (–460T>C) reside in the promoter region, rs2010963 (405C>G) and rs25648 (1032C>T) in the 5'UTR and rs3025029 (1689C>T) in the 3'UTR. These polymorphisms have been associated with a variation in the levels of VEGF protein [15–18] and predisposition to cancer development and progression [19–23].

Given the reported association of VEGF levels with certain clinical conditions in this leukemia, the present study evaluated whether an association exists between *VEGFA* genetic variability and its predictive value in determining the prognosis of CLL.

Materials and Methods

Study population

Two hundred and thirty-nine consecutive patients with newly diagnosed CLL from four Hospitals belonging to Grupo GLIMCE in Spain (Hospital Puerta de Hierro Majadahonda, Hospital de Getafe, Hospital Severo Ochoa [Madrid, Spain] and Hospital General [Valencia, Spain]) were enrolled in this retrospective study. Also, 183 age and gender-matched control individuals from the Blood Bank Department of Hospital Puerta de Hierro were analysed in order to evaluate the characteristic distribution of *VEGFA* single nucleotide polymorphisms (SNPs) in Spanish population from the same area. The diagnosis of CLL was based upon standard morphologic and immunophenotypic criteria. Written informed consent was given by participants for their clinical records to be used in this study. This project was approved by the Ethics Committee of Hospital Puerta de Hierro (Comité Ético de Investigación Clínica Hospital Puerta de Hierro Majadahonda). Progression of disease was defined according to NCI-Guidelines criteria [24].

The patient characteristics are summarised in Table 1. Genetic abnormalities were detected by conventional cytogenetics and FISH analysis and stratified as follows: very low-risk (deletion 13q), low-risk (trisomy 12 and normal karyotype) and intermediate-risk (deletion 11q) and high-risk (*TP53* deletion) [25]. The mutational status of the *IgVH* gene was analysed and classified according to ERIC recommendations [26]. CD38 and ZAP-70 expression was determined by flow cytometry.

Genotyping of *VEGFA* polymorphisms

DNA was extracted from peripheral blood cells using either DNAzol (MRC, Cincinnati, OH) or a Maxwell 16 Blood DNA purification kit (Promega Corp. Madison, CA). *VEGFA* rs699947 (–1540C>A), rs833061 (–460T>C), rs2010963 (405C>G), rs25648 (1032C>T) and rs3025039 (1689C>T) genotyping was

performed using TaqMan MGB probes (Applied Biosystems, Foster City, CA). All reactions were performed in a 10 µL PCR reaction with 20 ng of genomic DNA. Allelic discrimination was determined using 7500 Real Time PCR (Applied Biosystems). To validate the genotyping method and haplotype estimation, selected informative samples were analysed by DNA sequencing in a 3130xl Genetic Analyzer Sequencer (Applied Biosystems). Polymorphic positions were named relative to the reference sequence [Genbank: NM_001171630,1].

Statistical Analysis

Individual haplotypes and their frequencies were estimated based upon a Bayesian algorithm using the *Phase* program (available at <http://www.stat.washington.edu/stephens/phase.html> [27]). Linkage disequilibrium (LD) analysis was performed using Haploview software. Pearson's χ^2 test was used to evaluate differences in the distribution of *VEGFA* SNPs alleles, haplotypes or genotypes between subgroups of patients based upon clinical or laboratory parameters.

Odds Ratio (OR) values (95% confidence interval) for the relative risks were calculated for alleles, genotypes and haplotypes. Additive, dominant (major homozygous plus heterozygous vs minor homozygous) and recessive (major homozygous vs heterozygous plus minor homozygous) models were applied to detect associations between genotypes and the clinical and molecular variables.

OS (overall survival) was defined as the interval between the date of diagnosis and the time of death due to CLL. The OS times of patients alive at last follow-up or lost to follow-up were censored. The association between the cumulative probability of OS among genotypes or haplotypes was calculated according to the Kaplan-Meier method, while significant differences between survival curves were evaluated with Mantel's logrank test. Ten variables were screened by univariate analysis. Because some chromosomal aberrations resemble other molecular prognostic factors included as covariates (deletion 11q and deletion 17p corresponds to ΔATM and $\Delta TP53$, respectively), these were not included in the multivariate Cox model. CD38 and ZAP-70 were also excluded due to their elevated rate of missing values. All other variables were included in the adjusted analysis to verify their independent prognostic value. Statistical data analyses were performed using the Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) software (SPSS 15, Chicago, IL, USA).

Results

Characteristics of *VEGFA* polymorphisms in the patient cohort

We analysed the genotypes of five SNPs of the *VEGFA* gene, rs699947 (–1540C>A), rs833061 (–460T>C), rs2010963 (405C>G), rs3025039 (1689C>T) and rs25648 (1032C>T) on the basis of their previous description as genetic markers in other cancers and/or their potential effect on gene expression.

The cohort was comprised of 239 CLL patients with a mean age of 68 ± 12 years and a male:female ratio of 1.32:1. Minor allele frequencies of *VEGFA* polymorphisms in our CLL cohort were > 5% and are summarized in Table 2. We investigated the linkage disequilibrium (LD) of the *VEGFA* polymorphism in our study population. As the high LD of the four neighboring loci, rs699947, rs833061, rs2010963 and rs25648, was an evidence for shared segregation, we performed a haplotype analysis (data not shown). To perform an in-depth analysis, haplotypes were estimated from the genotypes defined by loci rs699947, rs833061 and rs2010963. The frequencies of the three main groups of haplotypes in the CLL

Table 1. Clinical and molecular characteristics of the CLL patients.

Variable		N (%)
Gender	Male	136 (56.9)
	Female	103 (43.1)
Age	<65	116 (48.5)
	>65	123 (51.5)
Binet stage	A	177 (74.1)
	B	51 (21.3)
	C	11 (4.6)
RAI stage	0	116 (48.5)
	I	54 (22.6)
	II	56 (23.4)
	III	6 (2.5)
	IV	7 (2.9)
Treatment	Yes	106 (44.4)
	No	132 (55.2)
	n.d.	1 (0.4)
Status	Dead	81 (33.9)
	Alive	158 (66.1)
Cause of death	Disease	73 (76.8)
	Other	8 (8.4)
Richter	Yes	16 (6.7)
	No	223 (93.3)
<i>Molecular data</i>		
<i>Genetic lesions</i>		
	Very low-risk (del13q)	67 (28.0)
	Low-risk (NC, +12)	116 (48.5)
	Intermediate-risk (del11q)	20 (8.4)
	High-risk (Δ TP53)	36 (15.1)
CD38 expression	Negative	178 (74.5)
	Positive	32 (13.4)
	n.d.	29 (12.1)
ZAP-70	Negative	60 (25.1)
	Positive	50 (20.9)
	n.d.	129 (54.0)
IgVH genes	M	98 (41)
	UM	124 (51.9)
	n.d.	17 (7.1)

NC: normal karyotype, n.d: not determined.
doi:10.1371/journal.pone.0101063.t001

Table 2. Minor allele frequencies (MAF) of the VEGF polymorphisms studied in CLL patients.

Locus	Alleles	Frequencies
rs699947	CA	0.45
rs833061	T:C	0.46
rs2010963	G:C	0.35
rs25648	C:T	0.15
rs3025039	C:T	0.13

doi:10.1371/journal.pone.0101063.t002

cohort were ACG (0.39), CTC (0.38) and CTG (0.21), respectively.

All haplotypic and allelic frequencies were highly similar to those presented by a cohort of healthy blood donors from the same area ($n = 183$, data not shown). Moreover, because the majority of the participants of this study were of Spanish Caucasian origin, all frequencies fall in the same range of series reported in previous studies of other populations of white ethnicity [20,28,29].

VEGFA genotypes and CLL survival

We investigated the prognostic value of *VEGFA* variants in relation to patients' overall survival (OS). For this, we monitored the entire cohort of 239 patients diagnosed from January 1997 to December 2010, with a median follow-up of 63.2 months (1.4–179.4) and a five-year survival of 77.4%. In this cohort, we studied the prognostic value of the *VEGFA* rs699947/rs833061/rs2010963 and rs3025039 and rs25648 polymorphisms (Fig. 1).

Comparison of their genotypes in a recessive genetic model showed that patients with the homozygous rs699947/rs833061/rs2010963 ACG genotype (ACG^{+/+}) presented an increased mortality rate compared with patients with other genotypes (Fig. 1A). The median OS of patients with the ACG^{+/+} genotype was 84.3 months compared with 173.1 months ($p = 0.001$) for patients with other genotypes (ACG^{+/+} = 1 copy ACG [ACG^{+/-}] + no copies ACG [ACG^{-/-}]). The adverse effect observed for the ACG haplotype appears to be recessive because patients with 1 copy of the risk haplotype (ACG^{+/-} genotypes) and in the absence of the risk genotype (ACG^{-/-} genotypes) behaved similarly, and no significant difference in median OS was observed between both groups (not reached vs 173.1 months, $p = 0.92$, Fig. 1B).

In addition to *VEGFA* genetics, other previously reported variables were also significant epidemiological, clinical and molecular risk factors in OS prediction in our cohort: clinical stage (Binet), *IgVH* mutational status, *ATM* deletions, *TP53* disruptions, cytogenetic abnormalities, CD38 status and age at diagnosis (data not shown).

In the multivariate Cox regression model for OS, the conventional variables that showed an independent prognostic value were *IgVH* mutational status, *ATM* deletions, *TP53* deletions and age of diagnosis. Additionally, the *VEGFA* ACG^{+/+} genotype was identified as a novel prognostic parameter in OS, independent of other known factors (adjusted HR = 2.1, $p = 0.005$, Table 3).

Influence of VEGF genetic polymorphisms on clinical and molecular low-risk CLL subgroups

To identify protective or risk interactions, a review of the distribution of *VEGFA* variability in different subgroups of CLL was undertaken and revealed an asymmetric frequency of the ACG^{+/+} genotypes in patients with different mutational status of the *IgVH* genes ($n = 222$). The frequency of haplotype ACG defined by loci rs699947/rs833061/rs2010963 was 0.49 in the group of patients with poor prognosis (unmutated *IgVH* genes; UM-CLL) and 0.38 in patients with favourable prognosis (mutated *IgVH* genes; M-CLL). No asymmetries in the distribution of the haplotype ACG was found between groups defined by other epidemiological, clinical or molecular parameters.

Comparison in a recessive genetic model of the *VEGFA* rs699947/rs833061/rs2010963 genotypes (ACG^{+/+} vs ACG^{+/-}) showed that homozygosity for the ACG haplotype was associated with forms of the disease with a worse prognosis. The ACG^{+/+} genotype was 2.5 times more common among individuals with unfavourable prognosis (UM-CLL) relative to other genotypes (OR = 2.5, two-sided $p = 0.012$). These recessive genetic associations do not denote an allele-dose effect as frequencies of heterozygous genotypes are not increased in the UM-CLL group (see Table 4). No statistical associations were found between the ACG^{+/+} genotype and other clinical or molecular variables analysed. Allele or genotype frequencies of polymorphisms rs3025039 and rs25648 also failed to associate with any of the analysed groups (data not shown).

As the aforementioned ACG^{+/+} genotype was asymmetrically distributed in UM-CLL and M-CLL patients, we analysed the OS independently in the two groups. We did not observe any influence of the ACG^{+/+} genotype on the OS of the UM-CLL group, but conversely, in the group of patients with a favourable outcome (M-CLL), this genotype significantly correlated with a shorter survival (median OS: ACG^{+/+} = 105.5 months vs ACG^{+/-} = not reached; $p = 0.025$; Fig. 2). To further investigate a possible biological influence of this *VEGFA* genotype on the outcome of low-risk CLL, we performed the analysis within groups of patients defined by other markers of indolent course. We categorized our group of CLL patients by age at diagnosis, cytogenetic abnormalities, CD38 status or Binet stage (Fig. 2). Similarly to the subgroup with favourable *IgVH* mutational status, in patients with very low or low-risk genetics (deletion 13q, trisomy 12, normal karyotype) a

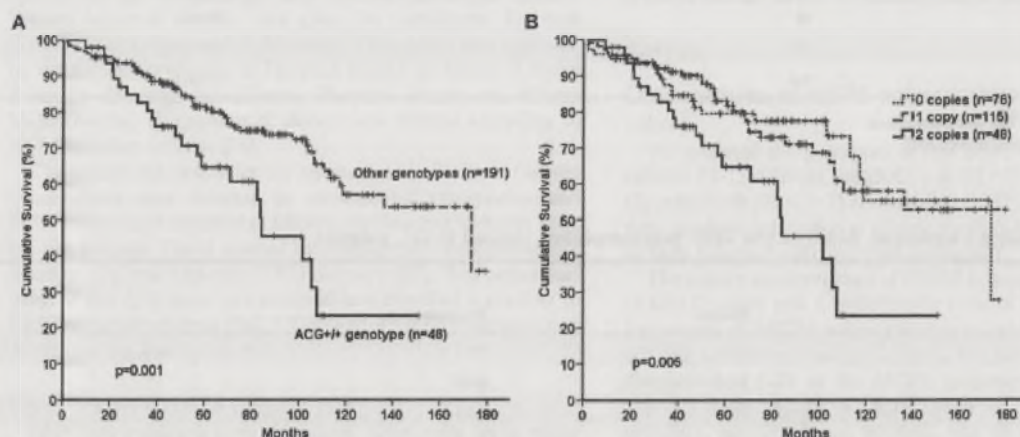


Figure 1. Association of *VEGFA* genotypes and OS of 239 CLL patients. Kaplan-Meier curves according to: (A) a recessive comparison of rs699947/rs833061/rs2010963 ACG^{+/+} genotype and, (B) number of copies of ACG haplotype. doi:10.1371/journal.pone.0101063.g001

Table 3. Multivariate analysis of the associations between VEGFAs699947/rs833061/rs2010963 genotypes and OS of CLL patients.

Variable	Comparison	HR (95% CI)	p-value
Age at diagnosis ^a	>65 vs <65	2.7 (1.7–4.4)	7×10^{-3}
Binet stage	B+C vs A	2.0 (1.2–3.4)	0.01
TP53 deletion	Yes vs No	3.8 (2.3–6.5)	5×10^{-7}
del11q	Yes vs No	1.9 (1.0–3.5)	0.051
IgVH genes	UM vs M	2.3 (1.3–4.3)	0.01
VEGFA genotypes ^b	ACG ^{+/+} vs others	2.1 (1.2–3.5)	0.005

^aPatients aged 65 year have been classified >65.^bHaplotype rs699947/rs833061/rs2010963.

HR: hazard ratio, Pos: positive, Neg: negative.

doi:10.1371/journal.pone.0101063.t003

decreased median OS from 173.1 to 101.7 months ($p = 1.3 \times 10^{-5}$) is associated with the presence of the ACG^{+/+} genotype. Again, the ACG^{+/+} genotype correlated with a reduction in the median OS from 173.1 to 105.5 months ($p = 0.031$) from 173.1 months to 82.3 months ($p = 3.8 \times 10^{-5}$) and from 173.1 to 84.3 ($p = 0.006$) in patients with an initial clinical stage (Binet A), negative expression of CD38 and age at diagnosis <65 years, respectively. In contrast, VEGFA genetics in the defined groups of poor outcome does not have any appreciable influence on the clinical course with the exception of the group of patients older than 65 years, in which the OS tended to be worse for those patients with the homozygous ACG^{+/+} genotype.

Discussion

It has been extensively reported that angiogenesis mediated by the irregular expression of proangiogenic factors such VEGF by leukemic cells plays an important role in the pathogenesis of CLL. In this study, we analysed the contribution of VEGFA genetics in the clinical outcome of the leukaemia.

An analysis of the impact on disease progression of VEGFA SNPs in our population-based CLL cohort demonstrated that the rs699947/rs833061/rs2010963 ACG genotype in homozygosity (ACG^{+/+}) is a strong independent predictor of OS. The

reduced survival observed in these patients could be related to increased angiogenesis as a result of an enhanced gene expression described for VEGFA variants rs699947, rs833061 and rs2010963. This would constitute a potential biological rationalization to the genetic association described in this work. Nonetheless, the justification to our findings could be due to other VEGF-mediated mechanisms of the pathogenesis of CLL. High-expressor VEGFA genotypes could increase the resistance to apoptosis, the cell motility or influence the microenvironment to generate more aggressive tumoral cells and consequently contribute to the progression of the leukaemia.

A further analysis of VEGFA genetics in CLL subgroups defined by different clinical and molecular parameters assessed an association between the VEGFA ACG^{+/+} genotype with a molecular marker of aggressive leukaemia: the unmutated status of the immunoglobulin variable gene segments (IgVH). IgVH mutation status parameter discriminates between leukaemia originating from B cells with an immunoglobulin gene submitted (mutated IgVH) or not (unmutated IgVH) to somatic hypermutation in the heavy chain variable region genes during ontogeny. Patients with a high number of mutations tend to have a better prognosis (M-CLL) than those with a low number (UM-CLL). Although the ACG^{+/+} genotype is less frequent among M-CLL patients, it correlated with a shorter overall survival within this category. A

Table 4. Distribution of VEGF genotypes in B-CLL groups with different mutational status of the IgVH genes.

Variant	Genotypes	M % (n) (N = 98)	UM % (n) (N = 124)	OR (95% CI) ^b	p-value
haplotype ACG ^a	X/X	35.7 (35)	29.0 (36)	1	
	ACG/X	52.0 (51)	45.2 (56)	1.1 (0.6–2.0)	0.83
	ACG/ACG	12.2 (12)	25.8 (32)	2.5 (1.2–5.2)	0.012
rs25648	C/C	72.4 (71)	70.2 (87)	1	
	C/T	26.5 (26)	29.0 (36)	0.9 (0.5–1.6)	0.69
	T/T	1.0 (1)	0.8 (1)	0.9 (0.5–1.6)	0.70
rs3025039	C/C	68.4 (67)	78.2 (97)	1	
	C/T	31.6 (31)	20.0 (26)	1.7 (0.9–3.2)	0.08
	T/T	0	0.8 (1)	1.7 (0.9–3)	0.1

M: patients with mutated IgVH genes, UM: patients with unmutated IgVH genes.

OR: odds ratio; CI, confidence interval.

^aHaplotype rs699947/rs833061/rs2010963. X genotype corresponds to n haplotypes other than ACG (CTC or CTG).^bThe upper homozygous genotype of each variant is designated the reference with an arbitrary OR value of 1 upon which the OR of the other genotypes are based.

Significant risk factors are shown in bold.

doi:10.1371/journal.pone.0101063.t004

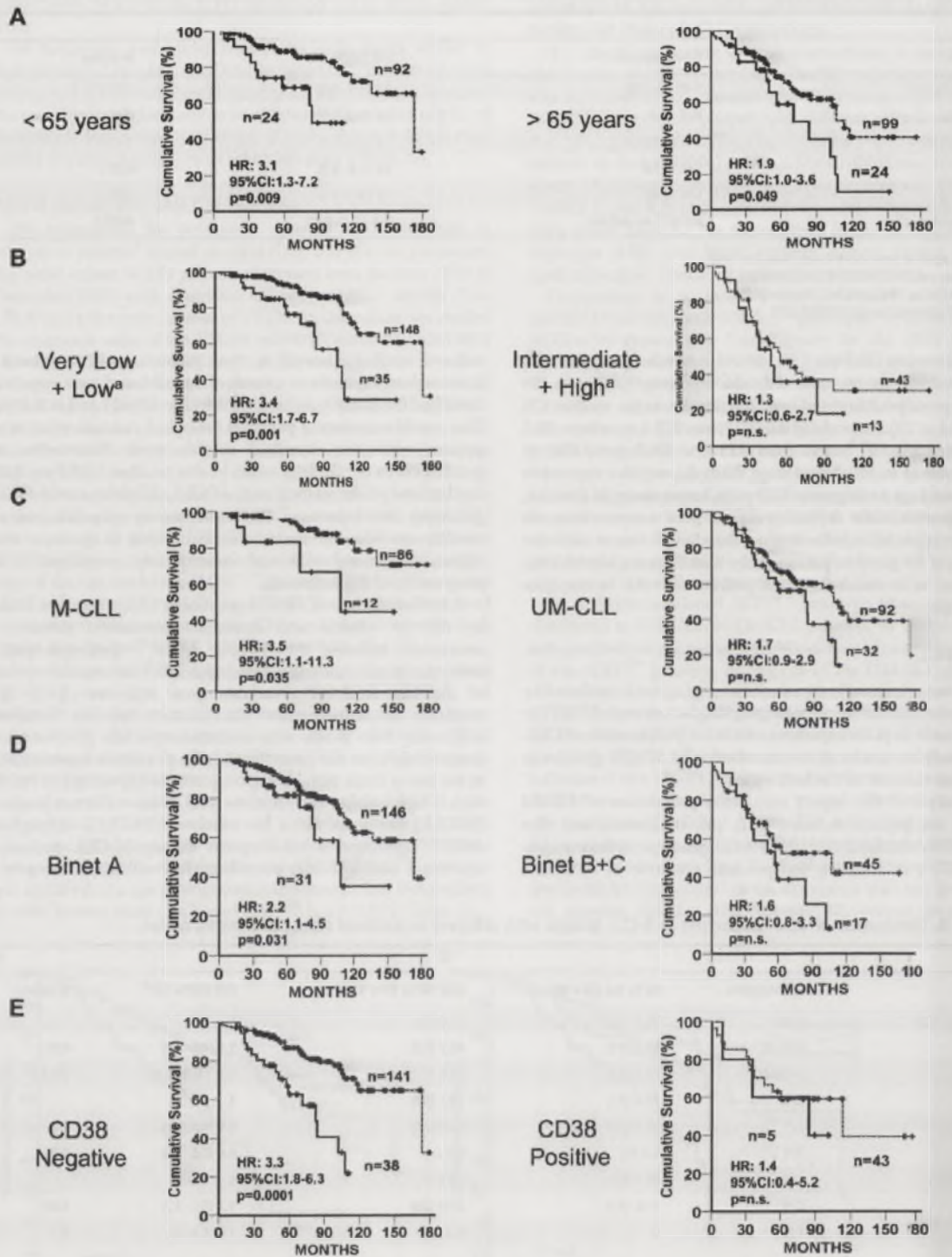


Figure 2. Association of VEGFA ACG+/+ genotype and OS of CLL patients with good prognostic features. Kaplan-Meier curves according to VEGFA ACG+/+ genotype (solid line) and other genotypes (dotted line) in subgroups of patients divided by (A) age at diagnosis, (B) IgVH mutational status, (C) Binet stage, (D) CD38 status and, (E) genetic abnormalities. ^aVery low (del13q), low (normal karyotype), intermediate ($\Delta 17M$) and high-risk ($\Delta 7p53$).

doi:10.1371/journal.pone.0101063.g002

similar adverse effect of the ACG^{+/+} genotype in disease progression was found when we stratified patients with good prognostic features such as genetic abnormalities of favourable prognosis, Binet stage A, negative expression of CD38 or early age at diagnosis. These results suggest a potential clinical utility of *VEGFA* genetics as predictors of reduced survival in patients with indolent leukaemia and would allow to further refine the classification of this group of CLL patients. Although our study did not find strong differences in survival associated to the ACG^{+/+} genotype in patients with poor prognostic features, this observation might be perhaps more apparent than real. The large effect of other molecular factors in subgroups of poor outcome may be masking the differences in survival associated with *VEGFA* genotypes. Although we observed a large effect of *VEGFA* genotypes in the subgroup analyses, we were not able to analyse an independent cohort of CLL patients to confirm these differences in survival. In this manner, further studies in other CLL cohorts should be performed to validate these results and would be of relevant interest the analysis of *VEGFA* genetics and CLL in other ethnic groups. To date, exist few reports studying *VEGFA* polymorphisms as prognostic markers of CLL. A recent publication of a case-control study in a Polish CLL cohort [30], described an increased frequency of the rs3025039 allele T in patients with advanced stage (Rai III/IV) compared to healthy individuals.

A previous work by Pepper *et al* [31], found an anti-apoptotic over-expression of VEGF in CLL cells with high levels of CD38, which was associated to the reduced prognosis of the CD38-positive patients. However, we found a similar distribution of the *VEGFA* polymorphisms in patients with different CD38 expression levels indicating that the elevated VEGF expression of this subgroup is not a result of their *VEGFA* genetic background.

The *VEGFA* gene 5'-flanking region is highly variable and contains strongly linked polymorphisms. This increased diversity complicates the characterization of *VEGFA* haplotypes in the promoter region, but some of these linkages are consistently preserved and associated with disease and high *VEGFA* expression [18,23]. Alleles A of rs699947 and C of rs833061 are associated with an upstream 18-nucleotide insertion that could modify the binding of factors in the *VEGFA* promoter. It has therefore been hypothesized that it could be responsible for the enhanced expression of this gene [20]. It would be interesting to perform further studies analysing the *VEGFA* levels in serum, the vascularity in the bone marrow and/or the resistance to apoptosis of CLL cells of patients with the *VEGFA* ACG^{+/+} genotype in order to explore the implication of this genotype in the physiopathology of the leukemia. A previous report [1], described an increased vascularity in the UM-CLL subset establishing subsequently a relation of a progressive phenotype of the leukaemia with an enhanced or aggressive angiogenic environment. This observation could be the result of the association of the UM-CLL subgroup with the high-expressor *VEGFA* ACG^{+/+} genotype that we have reported in this work.

The implication of the presence of increased vascularity in the bone marrow has been described in the outcome of various haematological diseases [32,33]. This led to the study of the

clinical significance of *VEGFA* genetics in other hematologic malignancies. In acute myeloid leukaemia, the rs699947/rs833061/rs2010963 CTG haplotype and rs3025029 C/C genotype influence the leukaemia-free survival (LFS), event-free survival (EFS) and overall survival (OS) of patients [34]. In chronic myeloid leukaemia, the rs699947 A/A and rs833061 C/C genotypes correlate with progression to advanced disease [35]. *VEGFA* polymorphisms also associate with clinical parameters in non-Hodgkin's lymphoma (NHL). In these patients, rs699947 CA and CA + AA genotypes and rs3025039 TT genotypes, as well as, rs699947 A and rs3025039 T alleles are associated with decreased risk for invasion [36]. Furthermore, rs3025039 T allele was found more frequently in NHLs with worse prognosis (patients with International Prognostic Index (IPI)-3 and/or 4) [37].

Elevated serum levels of its receptor, VEGF-R2 were also associated with lymphocytosis, severe anaemia and shortened survival in CLL [14]. These results also support the role of the VEGF system in this leukaemia and suggest a potential benefit in evaluating polymorphisms in *VEGF-R2* that might have an impact on CLL outcome.

It has been shown that disruption of proangiogenic factors can inhibit tumour vessel density and growth, and the combination of anti-angiogenic agents with other drugs has certain synergetic effects in improving the OR rate in solid tumours. Although, results of the first clinical trials evaluating anti-VEGF therapy for patients with CLL indicate a lack of efficacy in patients with relapsed/refractory CLL [38], combining VEGF blocking with conventional treatments may be a potential therapeutic approach for patients with CLL. In addition to the hypothetical use of *VEGFA* SNPs to predict the clinical outcome for CLL, these polymorphisms could be used as markers of clinical efficacy for chemoimmunotherapy with novel agents targeting VEGF or its receptor (VEGFR) to prevent leukaemia progression [39].

In conclusion, *VEGFA* genetic diversity appears to influence the physiopathology of CLL. The genotyping of polymorphisms in this gene can be performed easily using a rapid PCR method and, together with other parameters, these genetic markers might be utilized both in clinical practice and in further studies of CLL to upgrade patients' prognosis and select target therapies.

Acknowledgments

We are indebted to all individuals who kindly donated blood samples and to the blood bank, Biobank staff and all technicians in the Molecular Cytogenetics laboratory of the Hospital Puerta de Hierro who helped with the sample collection and characterization. We are also grateful to Teresa Hernando and Jose Luis Bueno who helped with the epidemiologic aspects of the work.

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: NGL. Performed the experiments: CLS JMV. Analyzed the data: JAGM NGL. Wrote the paper: NGL. Obtained the cytogenetic and molecular data: BFC NP RC JAGM. Provided clinical cases to the study: PSG FC JAGV BN JAGM. Performed the immunophenotyping analyses: JAGV. Reviewed the statistical analysis: IM JMG. Analysed the data: NGL JAGM CLS.

References

- Maffei R, Martinelli S, Castelli I, Santachiara R, Zucchini P, et al (2010) Increased angiogenesis induced by chronic lymphocytic leukemia B cells is mediated by leukemia-derived Ang2 and VEGF. *Leuk Res* 34: 312–321. S0145-2126(09)00319-1 [pii];10.1016/j.leukres.2009.06.023 [doi].
- Kini AR, Kay NE, Peterson LC (2000) Increased bone marrow angiogenesis in B cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 14: 1414–1418.
- Peterson L, Kini AR (2001) Angiogenesis is increased in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 97: 2529.
- Farahani M, Treweek AT, Toh CH, Till KJ, Harris RJ, et al (2005) Autocrine VEGF mediates the antiapoptotic effect of CD154 on CLL cells. *Leukemia* 19: 524–530. 2403631 [pii];10.1038/sj.leu.2403631 [doi].
- Bairey O, Boycov O, Kaganovsky E, Zimra Y, Shakkai M, et al (2004) All three receptors for vascular endothelial growth factor (VEGF) are expressed on B-

- chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells. *Leuk Res* 28: 243–248. S014521260300256X [pii].
6. Lee YK, Bone ND, Strega AK, Shanafelt TD, Jelinek DF, et al (2004) VEGF receptor phosphorylation status and apoptosis is modulated by a green tea component, epigallocatechin-3-gallate (EGCG), in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 104: 788–794. 10.1182/blood-2003-08-2763 [doi];2003-08-2763 [pii].
 7. Gehrmte I, Gandhirajan RK, Poll-Wolbeck SJ, Hallek M, Kreuzer KA (2011) Bone marrow stromal cell-derived vascular endothelial growth factor (VEGF) rather than chronic lymphocytic leukemia (CLL) cell-derived VEGF is essential for the apoptotic resistance of cultured CLL cells. *Mol Med* 17: 619–627. molmed.2010.00210 [pii];10.2119/molmed.2010.00210 [doi].
 8. Töl KJ, Spiller DG, Harris RJ, Chen H, Zuzel M, et al (2005) CLL, but not normal, B cells are dependent on autocrine VEGF and alpha4beta1 integrin for chemokine-induced motility on and through endothelium. *Blood* 105: 4815–4819. 2004-10-4054 [pii];10.1182/blood-2004-10-4054 [doi].
 9. Ugarte-Berzal E, Redondo-Munoz J, Eroles P, del Cerro MH, Garcia-Marco JA, et al (2010) VEGF/VEGFR2 interaction down-regulates matrix metalloproteinase-9 via STAT1 activation and inhibits B chronic lymphocytic leukemia cell migration. *Blood* 115: 846–849. blood-2009-08-239426 [pii];10.1182/blood-2009-08-239426 [doi].
 10. Edelmann J, Klein-Hippsch I, Carpinteiro A, Fuhrer A, Sellmann L, et al (2008) Bone marrow fibroblasts induce expression of PI3K/NF-kappaB pathway genes and a pro-angiogenic phenotype in CLL cells. *Leuk Res* 32: 1565–1572. S0145-2126(08)00126-4 [pii];10.1016/j.leukres.2008.03.003 [doi].
 11. Ghosh AK, Secreto CR, Knox TR, Ding W, Mukhopadhyay D, et al (2010) Circulating microvesicles in B-cell chronic lymphocytic leukemia can stimulate marrow stromal cells: implications for disease progression. *Blood* 115: 1755–1764. blood-2009-09-242719 [pii];10.1182/blood-2009-09-242719 [doi].
 12. Molica S, Vitelli G, Levato D, Gandolfo GM, Liso V (1999) Increased serum levels of vascular endothelial growth factor predict risk of progression in early B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 107: 605–610. bjh1752 [pii].
 13. Gora-Tybor J, Blonki JZ, Robak T (2005) Circulating vascular endothelial growth factor (VEGF) and its soluble receptors in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Eur Cytokine Netw* 16: 41–46.
 14. Ferrajoli A, Manshouri T, Estrov Z, Keating MJ, O'Brien S, et al (2001) High levels of vascular endothelial growth factor receptor-2 correlate with shortened survival in chronic lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res* 7: 795–799.
 15. Koulourakis MI, Papazoglou D, Giatromanolaki A, Bougioukas G, Maliezos E, et al (2004) VEGF gene sequence variation defines VEGF gene expression status and angiogenic activity in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer* 46: 293–298. S016500204002053 [pii];10.1016/j.jungcan.2004.04.037 [doi].
 16. Prior SJ, Hagberg JM, Paton CM, Douglass LW, Brown MD, et al (2006) DNA sequence variation in the promoter region of the VEGF gene impacts VEGF gene expression and maximal oxygen consumption. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 290: H1848–H1855. 01033.2005 [pii];10.1152/ajpheart.01033.2005 [doi].
 17. Renner W, Kotschan S, Hoffmann C, Obermayer-Pietsch B, Pilger E (2000) A common 936 C/T mutation in the gene for vascular endothelial growth factor is associated with vascular endothelial growth factor plasma levels. *J Vasc Res* 37: 443–448. 54076 [pii];54076 [doi].
 18. Watson CJ, Webb NJ, Bortomley MJ, Brenchley PE (2000) Identification of polymorphisms within the vascular endothelial growth factor (VEGF) gene: correlation with variation in VEGF protein production. *Cytokine* 12: 1232–1235. 10.1006/cyto.2000.0692 [doi];S1043-4666(00)90692-6 [pii].
 19. Awatu T, Inoue K, Kurihara S, Ohkubo T, Watanabe M, et al (2002) A common polymorphism in the 5'-untranslated region of the VEGF gene is associated with diabetic retinopathy in type 2 diabetes. *Diabetes* 51: 1635–1639.
 20. Brogan JJ, Khan N, Isaac K, Hutchinson JA, Pravica V, et al (1999) Novel polymorphisms in the promoter and 5' UTR regions of the human vascular endothelial growth factor gene. *Hum Immunol* 60: 1245–1249. S0198-8859(99)00132-9 [pii].
 21. Hansen TF, Spindler KL, Lorentzen KA, Olsen DA, Andersen RF, et al (2010) The importance of -460 G/T and +405 G/C single nucleotide polymorphisms to the function of vascular endothelial growth factor A in colorectal cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 136: 751–758. 10.1007/s00432-009-0714-1 [doi].
 22. Jain I, Vargo CA, Danesi R, Sissung TM, Price DK, et al (2009) The role of vascular endothelial growth factor SNPs as predictive and prognostic markers for major solid tumors. *Mol Cancer Ther* 8: 2496–2508. 1535-7163.MCT-09-0302 [pii];10.1158/1535-7163.MCT-09-0302 [doi].
 23. Stevens A, Soden J, Brenchley PE, Ralph S, Ray DW (2003) Haplotype analysis of the polymorphic human vascular endothelial growth factor gene promoter. *Cancer Res* 63: 812–816.
 24. Cheson BD, Bennett JM, Grever M, Kay N, Keating MJ, et al (1996) National Cancer Institute-sponsored Working Group guidelines for chronic lymphocytic leukemia: revised guidelines for diagnosis and treatment. *Blood* 87: 4990–4997.
 25. Rossi D, Rasi S, Spina V, Bruscaggin A, Monti S, et al (2013) Integrated mutational and cytogenetic analysis identifies new prognostic subgroups in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 121: 1403–1412. blood-2012-09-458265 [pii];10.1182/blood-2012-09-458265 [doi].
 26. Ghia P, Stamatopoulos K, Belesi C, Moreno C, Stiglmayr S, et al (2007) ERIC recommendations on IGHV gene mutational status analysis in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 21: 1–3. 2404457 [pii];10.1038/sj.leu.2404457 [doi].
 27. Stephens M, Smith NJ, Donnelly P (2001) A new statistical method for haplotype reconstruction from population data. *Am J Hum Genet* 68: 978–989. S0002-9297(07)61424-4 [pii];10.1086/319501 [doi].
 28. Freathy RM, Weedon MN, Shields B, Hitman GA, Walker M, et al (2006) Functional variation in VEGF is not associated with type 2 diabetes in a United Kingdom Caucasian population. *JOP* 7: 295–302. v07i03i05 [pii].
 29. Girmata DM, Webber SA, Ferrell R, Buckart CJ, Brooks MM, et al (2006) Disparate distribution of 16 candidate single nucleotide polymorphisms among racial and ethnic groups of pediatric heart transplant patients. *Transplantation* 82: 1774–1780. 10.1097/01.tp.0000250656.33731.8 [doi];00007890-200612270-00046 [pii].
 30. Wrobel T, Mazur G, Dzieczenia J, Gebura K, Kuliczowski K, et al (2013) VEGF and bFGF gene polymorphisms in Polish patients with B-CLL. *Med Oncol* 30: 456. 10.1007/s12032-013-0456-4 [doi].
 31. Pepper C, Ward R, Lin TT, Brennan P, Starczynski J, et al (2007) Highly purified CD38+ and. *Leukemia* 21: 687–696. 240587 [pii];10.1038/sj.leu.240587 [doi].
 32. Aguayo A, Kantarjian H, Manshouri T, Gidel C, Etey E, et al (2000) Angiogenesis in acute and chronic leukemias and myelodysplastic syndromes. *Blood* 96: 2240–2245.
 33. Hussong JW, Rodgers GM, Shami FJ (2000) Evidence of increased angiogenesis in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 95: 309–313.
 34. Kim DH, Lee NY, Lee MH, Sohn SK, Do YR, et al (2008) Vascular endothelial growth factor (VEGF) gene (VEGFA) polymorphism can predict the prognosis in acute myeloid leukaemia patients. *Br J Haematol* 140: 71–79. BJH6887 [pii];10.1111/j.1365-2141.2007.06887.x [doi].
 35. Kim DH, Xu W, Kamel-Reid S, Liu X, Jung CW, et al (2010) Clinical relevance of vascular endothelial growth factor (VEGFA) and VEGF receptor (VEGFR2) gene polymorphism on the treatment outcome following imatinib therapy. *Ann Oncol* 21: 1179–1188. mdp452 [pii];10.1093/annonc/mdq452 [doi].
 36. Diao LP, Yu XM, Gao YH, Li Y, Liu HS, et al (2009) Association of VEGF genetic polymorphisms with the clinical characteristics of non-Hodgkin's lymphoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 135: 1473–1481. 01007/s00432-009-0650-0 [doi].
 37. Wrobel T, Mazur G, Dzieczenia J, Gebura K, Kuliczowski K, et al (2013) VEGF and bFGF gene polymorphisms in patients with Non-Hodgkin's lymphoma. *BioMed Research International* 2013: 159813. 10.1155/2013/159813 [doi].
 38. Shanafelt T, Zent C, Byrd J, Erlichman C, LaPlant B, et al (2010) Phase II trials of single-agent anti-VEGF therapy for patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 51: 2222–2229. 10.3109/10428194.2010.524327 [doi].
 39. Shanafelt TD, Byrd JC, LaPlant B, Zent GS, Call T, et al (2009) Pretreatment angiogenic cytokines predict response to chemimmunotherapy in patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 146: 660–664. BJH7811 [pii];10.1111/j.1365-2141.2009.07811.x [doi].

Artículo II. Biallelic ATM alterations detected at diagnosis identify a subset of treatment-naïve chronic lymphocytic leukemia patients with reduced overall survival similar to patients with p53 deletion

La delección 11q es una de las alteraciones moleculares más importantes en el pronóstico de la LLC. Sin embargo, pocos estudios han investigado, el impacto pronóstico de las mutaciones del gen *ATM* en pacientes con delección 11q al diagnóstico. En este segundo trabajo, en 118 pacientes de reciente diagnóstico, se han analizado las alteraciones moleculares de los genes *ATM*, *BIRC3*, *SF3B1* (p.K700E) y *NOTCH1* (c.7544_7545delCT) para evaluar su impacto en la supervivencia de los pacientes con delección 11q.

Los pacientes que presentaron alteraciones bialélicas del gen *ATM* tuvieron un tiempo al primer tratamiento (SLT) similar y una menor supervivencia global (SG) comparado con los pacientes con delección 11q de forma aislada. Sin embargo, presentaron menor SLT y SG comparado con pacientes que no presentaron ninguna alteración del gen *ATM* (*ATM wild type*). Por otra parte, en el análisis multivariante, se detectó que los pacientes con esta inactivación bialélica presentaron un riesgo de muerte (HR: 6.4; $p \leq 0.007$) similar al de los pacientes con delección p53 (HR: 6.1; $p \leq 0.004$), e independiente respecto de otros parámetros que afectan de forma significativa la supervivencia, como la edad al diagnóstico, estadio avanzado y cariotipo complejo. Por el contrario, los pacientes con mutación en el gen *BIRC3* y delección 11q, no tuvieron ningún efecto en la SLT y en la SG en el análisis multivariante.

De esta manera, nuestros resultados sugieren que la identificación temprana de mutaciones del gen *ATM* en los pacientes con delección 11q, es clínicamente relevante para predecir la progresión, la respuesta adversa al tratamiento y por disminuir la SG independientemente de otros factores conocidos que afectan la supervivencia en la LLC.

Do Parents' Attitudes Relate to Children's Aggression? A Meta-Analysis

Thomas J. Patterson, Richard L. Milne, & Gregory B. Reid

Abstract This meta-analysis examined the relationship between parents' attitudes and children's aggression. The analysis included 10 studies with a total of 1,000 children and 1,000 parents. The results showed that parents' attitudes are significantly related to children's aggression, with a correlation coefficient of .30.

Keywords: aggression, children, parents, attitudes, meta-analysis

The relationship between parents' attitudes and children's aggression has been a topic of interest for many years. Some researchers have found that parents' attitudes are significantly related to children's aggression, while others have found no significant relationship. This meta-analysis was conducted to examine the relationship between parents' attitudes and children's aggression across a variety of studies.

The results of this meta-analysis show that there is a significant positive relationship between parents' attitudes and children's aggression. The correlation coefficient was .30, which indicates that parents' attitudes account for approximately 9% of the variance in children's aggression.

These findings have important implications for the development of interventions to reduce children's aggression. Interventions that focus on changing parents' attitudes may be effective in reducing children's aggression.

One of the most important factors in the development of children's aggression is the attitudes of their parents. Parents' attitudes can influence their children's behavior in a variety of ways.

First, parents' attitudes can influence their children's behavior through direct modeling. If a parent has a hostile attitude toward others, their child may learn to behave aggressively. Second, parents' attitudes can influence their children's behavior through indirect modeling. If a parent has a hostile attitude toward others, they may be more likely to use physical punishment, which can lead to aggressive behavior in their child.

Third, parents' attitudes can influence their children's behavior through the quality of the parent-child relationship. If a parent has a hostile attitude toward others, they may be less likely to have a positive relationship with their child, which can lead to aggressive behavior in the child.

Fourth, parents' attitudes can influence their children's behavior through the child's perception of the parent. If a child perceives their parent as hostile, they may be more likely to behave aggressively. Finally, parents' attitudes can influence their children's behavior through the child's perception of the parent's behavior. If a child perceives their parent as aggressive, they may be more likely to behave aggressively.

These findings have important implications for the development of interventions to reduce children's aggression. Interventions that focus on changing parents' attitudes may be effective in reducing children's aggression. For example, interventions that teach parents how to manage their own emotions and how to communicate effectively with their children may be helpful.

Another important implication of these findings is that parents' attitudes are a key factor in the development of children's aggression. Therefore, it is important for researchers to continue to study the relationship between parents' attitudes and children's aggression in order to develop more effective interventions.

In conclusion, this meta-analysis found that there is a significant positive relationship between parents' attitudes and children's aggression. The correlation coefficient was .30, which indicates that parents' attitudes account for approximately 9% of the variance in children's aggression. These findings have important implications for the development of interventions to reduce children's aggression.

One of the most important factors in the development of children's aggression is the attitudes of their parents. Parents' attitudes can influence their children's behavior in a variety of ways. First, parents' attitudes can influence their children's behavior through direct modeling. If a parent has a hostile attitude toward others, their child may learn to behave aggressively.

Second, parents' attitudes can influence their children's behavior through indirect modeling. If a parent has a hostile attitude toward others, they may be more likely to use physical punishment, which can lead to aggressive behavior in their child. Third, parents' attitudes can influence their children's behavior through the quality of the parent-child relationship.

If a parent has a hostile attitude toward others, they may be less likely to have a positive relationship with their child, which can lead to aggressive behavior in the child. Fourth, parents' attitudes can influence their children's behavior through the child's perception of the parent. If a child perceives their parent as hostile, they may be more likely to behave aggressively.

Finally, parents' attitudes can influence their children's behavior through the child's perception of the parent's behavior. If a child perceives their parent as aggressive, they may be more likely to behave aggressively. These findings have important implications for the development of interventions to reduce children's aggression.

ORIGINAL ARTICLE: CLINICAL

Biallelic *ATM* alterations detected at diagnosis identify a subset of treatment-naïve chronic lymphocytic leukemia patients with reduced overall survival similar to patients with p53 deletion

Carol Lozano-Santos^{a,c}, José A. García-Vela^b, Nuria Pérez-Sanz^a, Sara Nova-Gurumeta^a, Belen Fernandez-Cuevas^a, Natalia Gomez-Lozano^c, Margarita Sánchez-Beato^c, Pedro Sanchez-Godoy^d, José Luis Bueno^e and José A. García-Marco^a

^aHematology Department, Molecular Cytogenetics Unit, Hospital Universitario Puerta de Hierro-Majadahonda, Madrid, Spain;

^bHematology Department, Hospital Universitario de Getafe, Madrid, Spain; ^cInstitute of Research Puerta de Hierro-Majadahonda (IDIPHIM), Spain; ^dHematology Department, Hospital Severo Ochoa de Leganés, Madrid, Spain; ^eBlood Bank Unit, Hematology Department, Hospital Universitario Puerta de Hierro-Majadahonda, Madrid, Spain

ABSTRACT

The prognostic impact of biallelic *ATM* abnormalities (*ATM* mutation and concurrent 11q deletion) remains unknown. We studied *ATM*, *BIRC3*, *SF3B1*, and *NOTCH1* genes in 118 treatment-naïve CLL patients at diagnosis. Patients with biallelic *ATM* alteration had a similar time to first treatment (TTFT) and shorter overall survival (OS) compared with patients with isolated 11q deletion and shorter TTFT and OS when compared to patients with wild-type *ATM*. Furthermore, biallelic *ATM* alteration (HR: 6.4; $p \leq 0.007$) was significantly associated with an increased risk of death similar to p53 deletion (HR: 6.1; $p \leq 0.004$), superior to 11q deletion alone (HR: 2.8; $p \leq 0.022$) and independent of other significant parameters such as age, advanced clinical stage, and complex karyotype. Our results suggest the identification of *ATM* mutations in CLL patients with 11q deletion at diagnosis is clinically relevant and predicts disease progression, poor response to the treatment, and reduced OS independent of other molecular prognostic factors.

ARTICLE HISTORY

Received 21 April 2016
Revised 6 July 2016
Accepted 9 July 2016

KEYWORDS


ATM mutation; 11q deletion; prognostic markers; p53 deletion; chronic lymphocytic leukemia


Introduction

Genetic abnormalities are usually detected in chronic lymphocytic leukemia (CLL) at diagnosis in about 80% of cases and represent one of the prognostic parameters most frequently used for decisions related to treatment and survival evaluation.[1,2] Thus, abnormalities of the *TP53* gene are the most important predictive factor of chemoresistance and adverse outcome in CLL patients.[3,4] After 17p13.1 deletion, chromosome 11q22-q23 band (11q deletion) abnormality is the second most common cytogenetic alteration associated with poor prognosis.[5,6] At diagnosis, 11q deletion is detected in 10–15% of CLL cases,[7] which increases to 20–25% of CLL cases at first treatment and to 25–30% in cases refractory to fludarabine.[8–10] This deletion is associated with other features of adverse outcome, in particular, unmutated IgVH status.[11] Furthermore, 11q deletion defines a subset of CLL patients characterized by earlier disease

progression, shorter progression-free survival after treatment with standard chemotherapy, and reduced overall survival.[7,12–14] However, this poor outcome in CLL patients with 11q deletion seems to be overcome by the addition of immunotherapy with anti-CD20 antibodies (Rituximab, Obinutuzumab).[8,15]

The ataxia telangiectasia gene (*ATM*) is located within the minimally deleted region at the 11q22-q23 chromosome.[16] About 20–40% of patients with 11q deletion present mutations in the *ATM* gene.[17,18] In addition, CLL cases with 11q deletion can be divided into two genetic subgroups depending on the status of the remaining *ATM* allele.[19] A recent study indicated that CLL patients with biallelic *ATM* inactivation had shorter progression-free and overall survival (OS) when treated with alkylating agents and purine analogs.[18] Moreover, biallelic inactivation of the *ATM* gene does not exceed 40% of CLL cases with 11q deletion. Other studies have shown that 11q deletion

CONTACT Dr. José A. García-Marco jagardam@aeih.org  Molecular Cytogenetics Unit, Hematology Department, Hospital Universitario Puerta de Hierro-Majadahonda, Manuel de Falla 1, 28222, Madrid, Spain

 Supplemental data for this article can be accessed [here](#).

© 2016 Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group

affects different genes involved in cell cycle control and survival of tumor cells, and it is conceivable that these genes could also affect the prognosis of patients with 11q deletion.[19–21] In fact, *BIRC3*, a gene recently identified as being disrupted in CLL, is located at 11q22.2. Abnormalities of *BIRC3* have been associated with more aggressive CLL, poor survival independent of 11q deletion and chemorefractoriness in *TP53* wild-type patients.[22–24] As a result, many aspects of the prognostic significance of 11q deletion are still under study. Thus, CLL patients with 11q deletion are defined as a heterogeneous subset due to the different genes that are probably affected.[25,26] Consequently, our study sought to elucidate the clinical significance of somatic *ATM* mutations in CLL patients with 11q deletion detected at diagnosis.

Materials and methods

Chronic lymphocytic leukemia patients

The present study analyzed a cohort of 118 consecutive treatment-naïve patients at diagnosis of CLL. Samples were collected from two GLIMCE group hospitals for the study of chronic lymphoproliferative disorders (Hospital Universitario Puerta de

Hierro-Majadahonda, Hospital Universitario de Getafe, Madrid, Spain). CLL diagnosis was based on standard peripheral blood lymphocyte morphology and immunophenotype according to IWCLL criteria.[27] To better understand the impact of the molecular alterations in patients with 11q deletion, we included a higher number of CLL patients with del11q (40/118, 33.9%) detected at diagnosis by conventional cytogenetics and FISH from Hospital Universitario Severo Ochoa, Madrid, Spain (Figure 1). Prospective molecular cytogenetic characterization of 118 CLL cases at presentation was performed by karyotyping and FISH using specific probes for 13q14 (D13S25), 11q22-23 (*ATM*), chromosome 12 and 17p13.1 (*TP53*). Additionally, a mutational screening panel for *ATM*, *BIRC3*, *SF3B1*, and *NOTCH1* was retrospectively performed. IgVH mutation status was analyzed by direct sequencing, and patients were categorized as unmutated ($\geq 98\%$ germline homology) or mutated ($<98\%$ homology). The median age of 118 CLL patients at diagnosis was 64 years. The median follow-up was 72 months (range: 9–274.8 months) and 58 (49.1%) patients with clinical progression according to IWCLL were treated with different regimes (Supplemental Table 1). Moreover, we analyzed an additional cohort of 27 patients (55.6% patients with 11q deletion) in clinical



Figure 1. Heat map showing the incidence of molecular alterations among CLL patients with/without 11q deletion at diagnosis ($n = 118$). Gray rows represent individual patients corresponding to marker status. UM: unmutated; IgVH: immunoglobulin heavy variable gene.

Table 1. Multivariate analysis of OS in the CLL cohort at diagnosis with *ATM* mutation and 11q deletion status related to cause of death.

Variables	Multivariable analysis ($N = 118$)					
	OS (any cause of death)			OS (only CLL death)		
	HR	95%CI	p value	HR	95%CI	p value
Age >65 year vs <65 year	5.3	2.3–12.4	0.0001	3.6	1.4–9.1	0.006
Binet's BC vs A	3.9	1.7–8.9	0.001	3.2	1.3–8	0.011
ATM mutation/11q deletion status						
ATM wild-type group (reference, $n = 78$)						
Only ATM mutation ($n = 7$)			0.979			0.981
Only 11q deletion (wild-type <i>ATM</i> , $n = 31$)	2.7	1.2–5.7	0.012	2.8	1.2–6.7	0.022
Biallelic inactivation of <i>ATM</i> gene ($n = 9$)	5.3	1.6–18.2	0.007	6.4	1.6–25.4	0.007
17p deletion	4.6	1.4–14.6	0.011	6.1	1.7–21.3	0.004
Complex karyotype	3.5	1.3–9.2	0.013	3.8	1.3–10.9	0.013

CLL: chronic lymphocytic leukemia; OS: overall survival; HR: hazard ratio; 95%CI: confidence interval.

progression after the first-line treatment with purine analogs +/- rituximab (48.1%), alkylating agents +/- rituximab (48.1%) and alemtuzumab (3.8%), to assess the mutational frequency of *ATM*, *BIRC3*, *SF3B1*, and *NOTCH1* in relapsed CLL patients.

Genomic DNA was extracted from peripheral blood B-lymphocytes. Somatic or germline mutational status of *ATM* and *BIRC3* genes were studied in the DNA obtained from granulocytes in available samples. This Project was approved by the Ethics Committee of Hospital Universitario Puerta de Hierro-Majadahonda and conducted in accordance with the Declaration of Helsinki. All patients gave their informed consent for blood collection and the processing of biological analyses included in the present study.

Detection of mutations

Screening of sequence changes for *ATM* (exons 2-63) and *BIRC3* genes (exons 6-9) were performed by high-resolution melting analysis (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) and DNA sequencing in an ABI Prism 3130 automated DNA sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA). [23,24,28] Sequence changes were compared with current publications and several databases. *ATM* and *BIRC3* variants were classified as mutations if they were predicted to cause changes that altered functional effects of the protein, including splicing mutations, according to pathogenicity prediction methods, and also if they had previously been cataloged as somatic mutations of other cancers in different mutation databases. We analyzed *NOTCH1* mutation p.P2515fs*4 (exon 34) and *SF3B1* mutation p.K700E (exon 7), which represent approximately 80-90% and 40-50% of all *NOTCH1* and *SF3B1* mutations, respectively. [1] Detection of mutations was performed with a new qBiomarker Somatic Mutation Assay, based on allelic discrimination assessed by qPCR (Supplemental Methods).

Statistical methods

The statistical analysis was performed using SPSS Software 15.0 (Chicago, IL). Pearson's χ^2 test was used to determine significant differences in categorized variables. Time to first treatment (TTFT) and OS were estimated using the Kaplan-Meier method and the distributions of the curves were assessed using the log-rank test. TTFT was defined as the time interval between the date of diagnosis and the date of first treatment or the date of last follow-up for patients not receiving treatment and OS was defined as the time interval between the date of diagnosis and the date of death or last follow-up. For OS, death from any cause

or only related to CLL were analyzed in parallel. Univariate and multivariate analyses were performed using the Cox regression method. Interestingly, in our CLL cohort, patients with isolated *ATM* mutation were still alive ($n=5$). Since *ATM* mutation at diagnosis did not affect the OS of CLL patients, for statistical analysis these cases were included in the *ATM* wild-type group. Furthermore, patients with p53 deletion ($n=10$) were not included in the univariate analysis of *ATM* mutations and 11q deletion, because its adverse effect might interfere with survival in this categorization. An effect was considered statistically significant at $p \leq 0.05$.

Results

Frequency and distribution of CLL mutations

We identified 18 sequence changes in 14(11.8%)/118 CLL patients at diagnosis, which were classified as pathogenic *ATM* mutations (Supplemental Methods). Of the 7 samples with germline DNA available, somatic *ATM* mutations were identified in five patients at diagnosis and also in two treated patients. In addition, five of these *ATM* mutations have not previously been described and probably affect the FAT, TAN and PIKKc-ATM domains of the ATM protein. During the follow-up of newly diagnosed CLL patients, 58(49.1%)/118 cases received treatment and 14(24.1%)/58 patients were refractory to different treatments (Supplemental Table 1). Of them, seven patients had *ATM* mutation and three had concurrent 11q deletion.

Mutational screening of *BIRC3* identified five variants classified as mutations in 7(5.9%)/118 patients at diagnosis (Supplemental Table 2). Two mutations affected the CARD and RING domains and notably, three out of the five mutations have not previously been described. No *BIRC3* mutations were detected in the group of relapsed CLL patients, probably due to the low number of samples analyzed. In addition, *NOTCH1* (p.P2515fs*4) and *SF3B1* (p.K700E) mutations were analyzed from 118 newly diagnosed patients, in which p.P2515fs*4 mutation was found in 14(11.9%)/118 and p.K700E mutation in 10(8.5%)/118. Furthermore, in 26 out of the 27 previously treated CLL patients, *NOTCH1* and *SF3B1* mutations were detected in 4 (15.4%)/26 and 5(19.2%)/26, respectively.

Association of mutations with 11q deletion and other unfavorable prognostic variables

Deletion of 11q detected at CLL presentation was significantly associated with *ATM* (9/40 [22.5%]; $p=0.014$) mutations, *BIRC3* (6/40 [15%]; $p=0.006$) mutations,

unmutated *IgVH* genes ($p=0.048$), complex karyotype ($p=0.005$) and advanced clinical stage ($p=0.024$). Furthermore, we also studied different adverse clinical and biological parameters in CLL patients with *ATM* and *BIRC3* mutations. *ATM* mutations were more frequent in patients with unmutated *IgVH* genes (11/14 [78.5%]). In addition, it is remarkable that none of the patients with biallelic *ATM* inactivation had p53 deletion or complex karyotype. *BIRC3* mutations were significantly more frequent in patients with advanced stage, no trisomy 12 and unmutated *IgVH* genes. Moreover, *SF3B1* mutations were not associated with any variable, and *NOTCH1* mutations were significantly associated with ZAP-70 expression, trisomy 12, unmutated *IgVH* genes and no 13q deletion (Supplemental Table 3).

When molecular alterations between untreated and treated CLL cases were compared, we detected significantly more frequent CD38 expression, 11q deletion and unmutated *IgVH* genes in previously treated patients. However, we did not find any differences for *ATM* and *BIRC3* mutations. Only the frequency of *NOTCH1* and *SF3B1* mutations were slightly higher in previously treated patients (11.9% and 8.5%) compared to untreated CLL cases (15.4% and 19.2%).

Survival impact of *ATM* mutations in CLL patients with 11q deletion at diagnosis

TTFT and OS were assessed in different unfavorable prognostic variables in all CLL patients at diagnosis. To evaluate the effects of TTFT and OS in CLL patients with 11q deletion related to the mutational status of *ATM* gene, 118 CLL patients at diagnosis were stratified for the survival analysis: 5 (4.2%) patients had only monoallelic *ATM* mutation, 31 (26.3%) patients had *ATM* deletion alone, 9 (7.6%) patients had both *ATM* mutation and *ATM* deletion, and 73 (61.9%) were considered as wild-type *ATM* patients. Regarding *BIRC3* mutations, 78 (66.1%) patients had wild-type *BIRC3*, 34 (28.8%) patients had isolated 11q deletion and 6 (5.1%) patients had both *BIRC3* mutation and 11q deletion, and one patient had *BIRC3* mutation without 11q deletion.

Univariate analysis of OS ($n=108$) showed that CLL patients with biallelic *ATM* alteration had a higher risk of death (median OS: 60.2 months; HR: 8.1; 95%CI: 2.9–22.8, $p\leq 0.001$) compared with patients having only 11q deletion (median OS: 91.3 months; HR: 3.5; 95%CI: 1.6–8, $p\leq 0.002$) and patients with only *ATM* mutation (median not reached) (Figure 2). When we analyzed the TTFT ($n=108$), we observed significant differences between the patients with wild-type *ATM* (median 134 months) compared to patients with biallelic *ATM* inactivation (median TTFT 34 months,

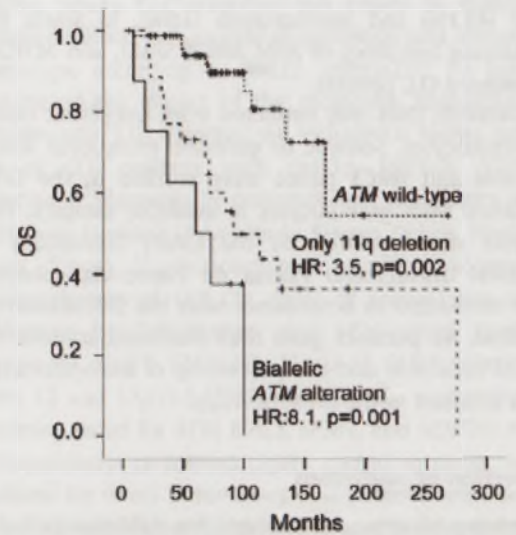


Figure 2. Impact of *ATM* mutation/del11q status on OS in CLL patients. The Kaplan-Meier estimates of OS in CLL patients at diagnosis ($n=108$). Patients classified as group of *ATM* wild-type ($n=68$); patients with 11q deletion alone ($n=26$) and patients with *ATM* mutation and 11q deletion ($n=9$). All CLL patients with isolated *ATM* mutation were still alive ($n=5$).

$p=0.01$). However, there was no difference when patients with biallelic *ATM* alterations were compared to patients with only 11q deletion (median TTFT 51 months, $p=0.65$). Subsequently, on multivariate analysis ($n=118$), the *ATM* mutation/11q deletion status was introduced into the model as a covariate. We examined the survival impact of biallelic *ATM* inactivation compared with other clinical and biological variables, such as age, gender, p53 deletion, Binet stage, *IgVH* status, complex karyotype and *NOTCH1*, *SF3B1*, and *BIRC3* mutations.

A multivariate Cox proportional hazards model for TTFT and OS was performed considering all causes of deaths in this cohort of 118 patients. The following variables were identified as independently associated with a shorter TTFT: gender, advanced clinical stage, unmutated *IgVH*, single 11q deletion, and p53 deletion (Supplemental Table 4). Furthermore, multivariate analysis for OS identified that patients with biallelic *ATM* alterations had a higher risk of death (HR: 5.3; 95%CI: 1.6–18.2, $p\leq 0.007$) than those with only 11q deletion (HR: 2.7; 95%CI: 1.2–5.7, $p\leq 0.012$) or wild-type *ATM*. The risk of death in CLL patients with p53 deletion was similar to the risk of patients older than 65 years. Thus, age is a variable that needs to be adjusted in CLL as it is a disease that mostly affects the elderly with an excess of deaths related to comorbidities. As a result, we developed a multivariate analysis that considered only CLL-related deaths. Like this, our results

showed that biallelic *ATM* alterations were significantly associated with an increased risk of death (HR: 6.4%; CI: 1.6–25.4, $p \leq 0.007$), similar to p53 deletion (HR: 6.1; 95%CI: 1.7–21.3, $p \leq 0.004$) and superior to cases with 11q deletion alone (HR: 2.8; 95%CI: 1.2–6.7, $p \leq 0.022$), wild-type *ATM* or other independently significant parameters, such as age, Binet's stage, and complex karyotype (Table 1). In contrast, patients with *BIRC3* mutation and 11q deletion had a significantly inferior OS in univariate analysis, however, this interaction appears to have no effect on TTFT and OS when analyzed with other variables in the multivariate analysis (data not shown).

Discussion

This study reports that *ATM* mutations and concurrent 11q deletion in newly diagnosed CLL patients can identify a subgroup of patients with a shorter OS similar to patients with p53 deletion. CLL patients with 11q deletion and *ATM* mutation detected at diagnosis were associated with an independent and significantly higher risk of death than other risk factors such as isolated 11q deletion, unmutated *IgVH* genes, older age, Binet's advanced stage and complex karyotype. Furthermore, in our CLL cohort, *BIRC3* (with or without 11q deletion), *NOTCH1*, and *SF3B1* mutations had no impact on TTFT and OS when these latter mutations are detected at diagnosis.

Our results showed that variables such as *ATM* and *BIRC3* mutations, unmutated *IgVH* genes, complex karyotype and advanced clinical Binet's stage, were associated with 11q deletion in agreement with other previous CLL cohort studies.[19,29] Moreover, the increased frequency of *ATM* mutations in untreated CLL patients with 11q deletion (9/40, 22.5%) compared to patients without 11q deletion (5/78, 6.4%) is consistent with previously published studies of CLL cohorts enriched with 11q deletion cases.[18,19] In addition, and similar to a previous study, we found no significant associations between *ATM* mutations and the study population's other clinical and biological variables.[18]

On the other hand, the frequency of *BIRC3*, *SF3B1*, and *NOTCH1* mutations and the association of these genes with other risk variables concurred with previous studies of CLL patients at diagnosis.[30–33] Nevertheless, in line with other series, we detected *SF3B1* (20%) and *NOTCH1* (16%) mutations more frequently in CLL patients in clinical progression than in patients at diagnosis (11.8% and 8.4%, respectively), despite the low number of cases treated. However, as opposed to other studies, *SF3B1* and *NOTCH1*

mutations did not have any impact on the OS in our CLL cohort.[34,35] Therefore, the association reported between 11q deletion and other variables such as *ATM*, *BIRC3*, and *SF3B1* mutations, requires further analyses of a larger cohort of CLL patients with 11q deletion at diagnosis.[22,33]

Few studies have examined the prognostic impact of *ATM* mutations in a cohort of untreated CLL patients with 11q deletion [19,30,31] and most studies were performed in previously untreated CLL patients in clinical progression, who had received the first-line chemotherapy in the context of the LRF-CLL4 trial. [18,22,29] However, the value of the data from our study derives from the CLL population studied, composed of a consecutive, newly diagnosed group of patients enriched with 11q deletions, who underwent a long follow-up (72 months) and the assessment of *ATM* mutational status with other genes recently implicated in the pathogenesis of CLL. Rose-Zerilli et al. [22] described that, in CLL patients studied just before front-line treatment, isolated monoallelic *ATM* mutations had no impact on OS and that the combination of 11q deletion and *ATM* mutation showed a significantly increased risk of death compared with patients having 11q deletion or wild-type *ATM*. However, the risk of death was approximately fourfold less than that for those with p53 deletion. In addition, a recent study did not detect any impact of biallelic *ATM* alteration in comparison to 11q deletion in a multivariate analysis for OS.[31] These results were different from our study, where CLL patients with biallelic *ATM* abnormalities at diagnosis had a risk of death similar to patients with p53 deletion. However, in our series we also detected that monoallelic *ATM* mutation as a sole genetic abnormality did not affect the OS at a median follow-up of 84 months (range: 45–106 months). We suggest that these differences could be attributable to a higher effect of biallelic *ATM* alterations in CLL patients at diagnosis because, with disease progression, other prognostic factors, such as p53 deletion, have a greater relevance to survival. Nevertheless, considering the frequency of 11q deleted cases with *ATM* mutations, additional studies are required that include a greater number of patients with biallelic *ATM* abnormalities. Moreover, our analysis showed that the impact of a double-hit *ATM* alteration (*ATM* mutation and 11q deletion) had no significant shorter TTFT in multivariate analysis in accordance with a recently reported study.[31]

In addition, we investigated the interaction of p53 deletion with the alteration of both *ATM* alleles. Our results showed that no CLL patients with biallelic *ATM* alteration had associated p53 deletion. Therefore, these results support the independent prognostic

impact of *ATM* mutations on the outcome of patients with 11q deletion regardless of the presence of p53 deletion. In CLL cells, 11q deletions are monoallelic [36] and the loss of *ATM* alleles due to 11q deletion also includes the loss of other genes, such as *BIRC3*, within the 11q region.[21,25] In our study, biallelic *BIRC3* abnormalities did not significantly affect the OS of patients in the multivariate model. This could possibly be a consequence of other markers contributing to the poor prognosis of CLL patients with *BIRC3* mutation (7/7 patients had unmutated *IgVH* genes, 6/7 had 11q deletion and 3/7 had *ATM* mutation). Indeed, our results agree with another recent study, where *BIRC3* deletion and/or mutation had no impact on overall and progression-free survival in CLL patients in progression.[22] However, the same study observed that some cases with 11q deletion did not include *BIRC3* deletion. Thus, *BIRC3* alterations at diagnosis should be confirmed in other CLL patient series to assess *BIRC3* and other genes deletions. In keeping with this fact, it has been proposed that haploinsufficiency of several concurrent genes involved in DNA damage response on 11q deleted regions may point to a proliferative advantage for CLL cells compared to biallelic *ATM* inactivation.[20,25]

Notably, the lack of *ATM* protein by biallelic alterations inhibits its pro-apoptotic function, thus cannot exercise optimal response to conventional chemotherapy leading to chemoresistance in CLL cells. It has been observed that the addition of anti-CD20 antibodies to chemotherapy improved the PFS at 3 years in CLL patients with 11q deletion.[8] Moreover, in a recent study, a clone with biallelic *ATM* inactivation achieved a proliferative advantage under standard FC chemotherapy.[37] Thus, in 11q deleted CLL cases, the early identification of *ATM* mutations would be necessary for the suitable application of DNA damaging chemioimmunotherapy or targeted compounds.

In summary, our results show that *ATM* mutations in CLL patients with 11q deletion at diagnosis had a significantly adverse impact on survival, similar to the poor outcome of patients with p53 deletion. Consequently, our data indicate that assessing the mutational status of the *ATM* gene in newly diagnosed CLL patients with 11q deletion could be a useful tool for monitoring disease progression and the choice of therapeutic options with new agents when biallelic *ATM* abnormalities arise.

Acknowledgements

The authors wish to thank Natividad Polo of the Molecular Cytogenetics laboratory who helped with karyotype analysis,

Isabel Millán who helped with statistical analysis, Davide Rossi for providing a set of primers for *BIRC3* mutational screening, and Martin Hadley-Adams for reviewing the English language.

Potential conflict of interest: Disclosure forms provided by the authors are available with the full text of this article online as "ICMJE Disclosure Form" at <http://dx.doi.org/10.1080/10428194.2016.1213829>.

References

- [1] Foa R, Del G I, Guarini A, et al. Clinical implications of the molecular genetics of chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica*. 2013;98:675–685.
- [2] Zenz T, Mertens D, Dohner H, et al. Importance of genetics in chronic lymphocytic leukemia. *Blood Rev*. 2011;25:131–137.
- [3] Gonzalez D, Martinez P, Wade R, et al. Mutational status of the TP53 gene as a predictor of response and survival in patients with chronic lymphocytic leukemia: results from the LRF CLL4 trial. *J Clin Oncol*. 2011;29:2223–2229.
- [4] Trbusek M, Smardova J, Malcikova J, et al. Missense mutations located in structural p53 DNA-binding motifs are associated with extremely poor survival in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 2011;29:2703–2708.
- [5] Greipp PT, Smoley SA, Viswanatha DS, et al. Patients with chronic lymphocytic leukaemia and clonal deletion of both 17p13.1 and 11q22.3 have a very poor prognosis. *Br J Haematol*. 2013;163:326–333.
- [6] Zenz T, Mertens D, Kuppers R, et al. From pathogenesis to treatment of chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Cancer*. 2010;10:37–50.
- [7] Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A, et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2000;343:1910–1916.
- [8] Hallek M, Fischer K, Fingerle-Rowson G, et al. Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet*. 2010;376:1164–1174.
- [9] Stilgenbauer S, Zenz T, Winkler D, et al. Subcutaneous alemtuzumab in fludarabine-refractory chronic lymphocytic leukemia: clinical results and prognostic marker analyses from the CLL2H study of the German Chronic Lymphocytic Leukemia Study Group. *J Clin Oncol*. 2009;27:3994–4001.
- [10] Zenz T, Habe S, Denzel T, et al. Detailed analysis of p53 pathway defects in fludarabine-refractory chronic lymphocytic leukemia (CLL): dissecting the contribution of 17p deletion, TP53 mutation, p53-p21 dysfunction, and miR34a in a prospective clinical trial. *Blood*. 2009;114:2589–2597.
- [11] Ouillette P, Collins R, Shakhani S, et al. Acquired genomic copy number aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2011;118:3051–3061.
- [12] Britt-Compton B, Lin TT, Ahmed G, et al. Extreme telomere erosion in *ATM*-mutated and 11q-deleted CLL patients is independent of disease stage. *Leukemia*. 2012;26:826–830.

- [13] Marasca R, Maffei R, Martinelli S, et al. Clinical heterogeneity of de novo 11q deletion chronic lymphocytic leukaemia: prognostic relevance of extent of 11q deleted nuclei inside leukemic clone. *Hematol Oncol*. 2013;31:88–95.
- [14] Wierda WG, O'Brien S, Wang X, et al. Multivariable model for time to first treatment in patients with chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol*. 2011;29:4088–4095.
- [15] Goede V, Fischer K, Busch R, et al. Obinutuzumab plus chlorambucil in patients with CLL and coexisting conditions. *N Engl J Med*. 2014;370:1101–1110.
- [16] Stilgenbauer S, Liebisch P, James MR, et al. Molecular cytogenetic delineation of a novel critical genomic region in chromosome bands 11q22.3-923.1 in lymphoproliferative disorders. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996;93:11837–11841.
- [17] Austen B, Powell JE, Alvi A, et al. Mutations in the ATM gene lead to impaired overall and treatment-free survival that is independent of IGVH mutation status in patients with B-CLL. *Blood*. 2005;106:3175–3182.
- [18] Skowronska A, Parker A, Ahmed G, et al. Biallelic ATM inactivation significantly reduces survival in patients treated on the United Kingdom Leukemia Research Fund Chronic Lymphocytic Leukemia 4 trial. *J Clin Oncol*. 2012;30:4524–4532.
- [19] Austen B, Skowronska A, Baker C, et al. Mutation status of the residual ATM allele is an important determinant of the cellular response to chemotherapy and survival in patients with chronic lymphocytic leukemia containing an 11q deletion. *J Clin Oncol*. 2007;25:5448–5457.
- [20] Malek SN. The biology and clinical significance of acquired genomic copy number aberrations and recurrent gene mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Oncogene*. 2013;32:2805–2817.
- [21] Stankovic T, Skowronska A. The role of ATM mutations and 11q deletions in disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma*. 2014;55:1227–1239.
- [22] Rose-Zerilli MJ, Forster J, Parker H, et al. ATM mutation rather than BIRC3 deletion and/or mutation predicts reduced survival in 11q-deleted chronic lymphocytic leukemia: data from the UK LRF CLL4 trial. *Haematologica*. 2014;99:736–742.
- [23] Rossi D, Fangazio M, Rasi S, et al. Disruption of BIRC3 associates with fludarabine chemorefractoriness in TP53 wild-type chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2012;119:2854–2862.
- [24] Rossi D, Rasi S, Spina V, et al. Integrated mutational and cytogenetic analysis identifies new prognostic subgroups in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2013;121:1403–1412.
- [25] Gardiner A, Parker H, Glide S, et al. A new minimal deleted region at 11q22.3 reveals the importance of interpretation of diminished FISH signals and the choice of probe for ATM deletion screening in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res*. 2012;36:307–310.
- [26] Korz C, Pscherer A, Benner A, et al. Evidence for distinct pathomechanisms in B-cell chronic lymphocytic leukemia and mantle cell lymphoma by quantitative expression analysis of cell cycle and apoptosis-associated genes. *Blood*. 2002;99:4554–4561.
- [27] Cheson BD, Bennett JM, Grever M, et al. National Cancer Institute-sponsored Working Group guidelines for chronic lymphocytic leukemia: revised guidelines for diagnosis and treatment. *Blood*. 1996;87:4990–4997.
- [28] Nguyen-Dumont T, Calvez-Kelm FL, Forey N, et al. Description and validation of high-throughput simultaneous genotyping and mutation scanning by high-resolution melting curve analysis. *Hum Mutat*. 2009;30:884–890.
- [29] Skowronska A, Austen B, Powell JE, et al. ATM germline heterozygosity does not play a role in chronic lymphocytic leukemia initiation but influences rapid disease progression through loss of the remaining ATM allele. *Haematologica*. 2012;97:142–146.
- [30] Hernandez JA, Hernandez-Sanchez M, Rodriguez-Vicente AE, et al. A low frequency of losses in 11q chromosome is associated with better outcome and lower rate of genomic mutations in patients with chronic lymphocytic leukemia. *PLoS One*. 2015;10:e0143073.
- [31] Hurtado AM, Chen-Liang TH, Przychodzen B, et al. Prognostic signature and clonality pattern of recurrently mutated genes in inactive chronic lymphocytic leukemia. *Blood Cancer J*. 2015;5:e342.
- [32] Rossi D, Rasi S, Fabbri G, et al. Mutations of NOTCH1 are an independent predictor of survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2012;119:521–529.
- [33] Wang L, Lawrence MS, Wan Y, et al. SF3B1 and other novel cancer genes in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med*. 2011;365:2497–2506.
- [34] Baliakas P, Hadzidimitriou A, Sutton LA, et al. Recurrent mutations refine prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia*. 2015;29:329–336.
- [35] Rossi D, Bruscaggin A, Spina V, et al. Mutations of the SF3B1 splicing factor in chronic lymphocytic leukemia: association with progression and fludarabine-refractoriness. *Blood*. 2011;118:6904–6908.
- [36] Edelmann J, Holzmann K, Miller F, et al. High-resolution genomic profiling of chronic lymphocytic leukemia reveals new recurrent genomic alterations. *Blood*. 2012;120:4783–4794.
- [37] Schuh A, Becq J, Humphray S, et al. Monitoring chronic lymphocytic leukemia progression by whole genome sequencing reveals heterogeneous clonal evolution patterns. *Blood*. 2012;120:4191–4196.

Supplemental Table I: Therapeutic regimens and clinical response in 58/118 patients requiring treatment.

Treatment Regime in 1st Line	Nº Patients (%)	Response
Purine analogs	24 (41.4%)	7 CR, 6 PR, 11 refractory
Purine analogs with Rituximab	19 (32.8%)	14 CR, 4 PR, 1 refractory
Alkylating agents	5 (8.6%)	5 PR
Alkylating agents with Rituximab	4 (6.9%)	1 CR, 2 PR, 1 refractory
Regimens with Alemtuzumab	6 (10.3%)	3 CR, 2 PR, 1 refractory

Abbreviations: CLL, chronic lymphocytic leukaemia; CR, complete response; PR, partial response.

Supplemental Table II: *ATM* and *BIRC3* mutations in CLL patients.

ATM mutations in CLL patients at diagnosis

CLL patients	Exon/ Intron	Nucleotide change	Type of mutation	Germline G) / acquired (S)	del11q	Amino acid change	Domain protein	COSMIC o HGMD	Reported previously	Polyphen	
										Prediction	Score
9501	2	16 A>G	Missense	S	T	p.N6D		N	Undescribed	Probably damaging	0,91
9501	2	c.17del	Frameshift	S	T	p.N6Mfs*10		N	Undescribed		
7971	4	c.245_246insTT	Frameshift	S	T	p.S83Yfs*34	TAN	N	Undescribed		
14372	10	c.1351insT	Frameshift	S	F	p.R451fs		N	Undescribed		
11763	20	c.2941C>T	Missense	ND	F	p.R981C		N	HBOC	Probably damaging	0,99
2353	29	c.4388T>G	Missense	ND	T	p.F1463C		CM022199	Breast cancer	Probably damaging	1
7115	I-32	IVS34 ds+1 G-A	Splicing	ND	T			CS991305	AT		
14407	49	c.7187 C>G	Missense	ND	F	p.T2396S	FAT	CM092586	T-PLL		
14745	49	c.7280T>G	Missense	ND	T	p.L2427R	FAT	COSM22530	AT	Probably damaging	0,99
2301	50	c.7397C>T	Missense	ND	T	p.A2466V	FAT	CM014794	Breast cancer	Probably damaging	1
3395	50	c.7397C>T	Missense	ND	T	p.A2466V	FAT	CM014794	Breast cancer	Probably damaging	1
5682	56	c.8196C>G	Missense	ND	T	p.F2732L	PIKKc_ATM	N	Undescribed	Probably damaging	1
7871	63	c.9023 G>A	Missense	S	F	p.R3008H		CM092589	CLL, MCL, DLBCL	Possibly damaging	1
7657	63	c.9023 G>A	Missense	S	F	p.R3008H		CM092589	CLL, MCL, DLBCL	Possibly damaging	1
618	63	c.9139C>T	Nonsense	ND	T	p.R3047*	FATC	CM960114	MCL	Probably damaging	1

ATM mutations in Treated-CLL patients

129	50	c.7397C>T	Missense	ND	T	p.A2466V	FAT	CM014794	Breast cancer	Probably damaging	1
699	50	c.7330G>A	Missense	ND	T	p.E2444K	FAT	COSM1506626	Lung carcinoma		
11233	54	c.7976 T>C	Missense	S	T	p.L2659S		N	Undescribed	Probably damaging	0,992
14576	63	c.9023 G>A	Missense	S	F	p.R3008H		CM092589	CLL, MCL, LBCL		

BIRC3 mutations in CLL patients at diagnosis

CLL patients	Exon/ Intron	Nucleotide change	Type of mutation	Germline (G)/ acquired (S)	del11q	Amino acid change	Domain protein	COSMIC o HGMD	Reported previously	Polyphen	
										Prediction	Score
14745	6	c.1282delA	Frameshift	ND	T	p.R428fs*19		COSM1737950	CLL		
1796	7	c.1500 A>C	Missense	ND	T	p.L500F	CARD	N	Undescribed	Probably damaging	0,91
7971	7	c.1500 A>C	Missense	ND	T	p.L500F	CARD	N	Undescribed	Probably damaging	0,91
3739	I-7	IVS7 -1 G-C	Splicing	ND	T			N	Undescribed		
7971	I-7	IVS7 -1 G-C	Splicing	ND	T			N	Undescribed		
14012	8	c.1592delT	Frameshift	ND	F	p.I531fs*		N	Undescribed		
3395	9	c.1678 T>A	Missense	ND	T	p.C560S	RING-Type	N	MCL	Possibly damaging	0,997
941	9	c.1678 T>A	Missense	ND	T	p.C560S	RING-Type	N	MCL	Possibly damaging	0,997

Abbreviations: Genes annotated in the COSMIC database v83: Y, yes; N, no. ND: no data. CLL, Chronic Lymphocytic Leukemia; MCL, Mantle Cell Lymphoma; DLBCL, Diffuse Large B Cell Lymphoma, HBOC, hereditary breast and ovarian cancer; NHL, non-Hodgkin lymphoma; AT, Ataxia-telangiectasia; T-PLL and T-Cell Prolymphocytic Leukemia.



Supplemental Table III. Biological and clinical characteristics of CLL patients at diagnosis according to *ATM*, *BIRC3*, *SF3B1* (p.K700E) and *NOTCH1* (p.P2515fs*4) mutational status.

CLL at diagnosis (n=118)																													
Parameters		ATM wt		ATM mut		P	BIRC3 wt		BIRC3 mut		P	SF3B1 (p.K700E) wt		SF3B1 (p.K700E) mut		P	NOTCH1 (p.P2515fs*4) wt		NOTCH1 (p.P2515fs*4) mut		P								
		n	%	n	%		n	%	n	%		n	%	n	%		n	%											
Gender	Male	35	33.7	3	21.4		74	66.7	6	85.7		75	69.4	5	50		73	70.2	7	50		0.114							
	Female	69	66.3	11	78.6	0.276	37	33.3	1	14.3	0.277	33	30.6	5	50	0.181	31	29.8	7	50									
Age (years)	<65	54	51.9	8	57.1		60	54.1	2	28.6		58	53.7	4	40		54	51.9	8	57.1		0.469							
	>65	50	48.1	6	42.9	0.469	51	45.9	5	71.4	0.180	50	46.3	6	60	0.309	50	48.1	6	42.9									
Binet Stage	A	68	65.4	7	50		75	67.6	0	0		66	61.1	9	90		66	63.5	9	64.3		0.600							
	B+C	36	34.6	7	50	0.203	36	32.4	7	100	0.001	42	38.9	1	10	0.060	38	36.5	5	35.7									
Global response to treatment	Refractory	11	10.6	3	21.4		12	10.8	3	42.9		15	13.9	0	0		14	13.5	1	7.1		0.07							
	Response	40	38.5	4	28.6		40	36	3	42.9		38	35.2	5	50		34	32.7	9	64.3									
	nt	53	51	7	50	0.127	59	53.2	1	14.2	0.025	55	50.9	5	50	0.34	56	53.8	4	28.6									
Treatment	Yes	51	49.00	7	50		52	46.8	6	85.7		53	49.1	5	50		48	46.2	10	71.4		0.067							
	No	53	51.00	7	50	0.585	59	53.2	1	14.3	0.052	55	50.9	5	50	0.607	56	53.8	4	28.6									
Richter	Yes	96	92.3	1	7.1		7	6.3	2	28.6		8	7.4	1	10		8	7.7	1	7.1		0.711							
	No	8	7.7	13	92.9	0.711	104	93.7	5	71.4	0.089	100	92.6	9	90	0.563	96	92.3	13	92.9									
Status	Dead	33	31.7	6	42.9		34	30.6	5	83.3		35	32.4	4	40		34	32.7	5	35.7		0.520							
	Alive	71	68.3	8	57.1	0.293	77	69.4	1	16.7	0.039	73	67.6	6	60	0.433	70	67.3	9	64.3									
ZAP-70 expression	Negative	24	23.1	4	28.6		26	23.4	2	28.6		27	25.0	1	10		25	24.0	3	21.4		0.020							
	Positive	30	28.8	2	14.3		30	27.0	3	42.9		28	25.9	4	40		24	23.1	8	57.2									
	nd	50	48.1	8	57.1	0.515	55	49.6	2	28.6	0.933	53	49.1	5	50	0.463	55	52.9	3	21.4									
CD38 expression	Negative	80	77	9	64.3		84	75.7	5	71.4		82	75.9	7	70		80	76.9	9	64.3		0.401							
	Positive	17	16.3	2	14.3		18	16.2	1	14.3		17	15.8	2	20		15	14.4	4	28.6									
	nd	7	6.7	3	21.4	0.179	9	8.1	1	14.3	0.849	9	8.3	1	10	0.916	9	8.7	1	7.1									
13q deletion	Yes	48	47.1	7	50		60	54.1	4	57.1		50	46.3	5	50		53	51.0	2	14.3		0.009							
	No	56	53.8	7	50	0.504	51	45.9	3	42.9	0.424	58	53.7	5	50	0.540	51	49.0	12	85.7									
11q deletion	Yes	31	29.8	9	64.3		34	30.6	6	85.7		36	33.3	4	40		36	34.6	4	28.6									

No	73	70.2	5	35.7	0.014	77	69.4	1	14.3	0.006	72	66.7	6	60	0.457	68	65.4	10	71.4	0.452
Trisomy 12	16	15.4	0	0		16	14.4	0	0		16	14.8	0	0		11	10.6	5	35.7	
Yes	85	81.7	13	92.9		93	83.8	5	71.4		88	81.5	10	100		91	87.5	7	50	
No	3	2.9	1	7.1	0.223	2	1.8	2	28.6	0.001	4	3.7	0	0	0.328	2	1.9	2	14.3	0.001
nd																				
Complex	13	12.5	4	28.6		96	86.5	2	28.6		16	14.8	1	10		16	15.4	1	7.1	
Yes	91	87.5	10	71.4	0.118	15	13.5	5	71.4	0.265	92	85.2	9	90	0.561	88	84.6	13	92.9	0.364
No						14	12.5	3	42.9		13	12.0	3	30		16	15.4	0	0	
ATM mutation						98	87.5	4	57.1	0.052	95	88.0	7	70	0.135	88	84.6	14	100	0.114
Mutated																				
Unmutated																				
status																				
Unmutated																				
BIRC3																				
mutation	4	3.8	3	21.4							7	6.5	0	0		7	6.7	0	0	
Mutated	100	96.2	11	78.6	0.052						101	93.5	10	100	0.529	97	93.3	14	100	0.403
status																				
Unmutated																				
SF3B1																				
mutation	7	6.7	3	21.4		10	9.0	0	0							9	8.7	1	7.1	
Mutated																				
status																				
Unmutated	97	93.3	11	78.6	0.097	101	91.0	7	100	0.529						95	91.3	13	92.9	0.663
(p.K700E)																				
NOTCH1																				
mutation	14	13.5	0	0		14	12.6	0	0		13	12.0	1	10						
Mutated																				
Status																				
(p.P2515fs*4)	90	86.5	14	100	0.152	97	87.4	7	100	0.403	95	88.0	9	90	0.663					
Unmutated																				
p53 deletion	9	8.8	0	0		9	8.1	1	14.3		98	90.7	0	0		9	8.7	1	7.1	
Yes	93	91.2	14	100	0.268	102	91.9	6	85.7	0.471	10	9.3	10	100	0.397	95	91.3	13	92.9	0.663
No																				
IgVH mutation	50	48.1	3	21.4		53	47.7	0	0		51	47.2	5	55.6		51	49.0	2	14.3	
Mutated	50	48.1	11	78.6		54	48.6	7	100		53	49.1	2	22.2		49	47.1	12	85.7	
status																				
Unmutated	4	3.8	0	0	0.09	4	3.6	0	0	0.031	4	3.7	2	22.2	0.167	4	3.9	0	0	0.25
nd																				

Supplemental Table IV: Multivariate analysis of SLT in the CLL cohort at diagnosis with *ATM* mutation and 11q deletion status.

Variables	Multivariable analysis (N=118)		
	HR	95%CI	p-value
Age >65y vs <65y	1.2	0.64 to 6.7	0.62
Gender Male vs Female	1.9	1.1 to 3.7	0.04
Binet BC vs A	2.9	1.7 to 5.2	0.0001
ATM mutation / 11q deletion Status			
ATM wild-type group (reference, n=73)			
Only ATM mutation (n=5)	0.5	0.13 to 3.9	0.522
Only 11q deletion (wild-type <i>ATM</i> , n=31)	1.8	1 to 3.3	0.04
Biallelic inactivation of <i>ATM</i> gene (n=9)	2.2	1 to 5.8	0.09
17p deletion	6.8	2.7 to 16.8	0.0001
IgVH status UM vs M	2.8	1.4 to 5.7	0.003
Complex karyotype	1.7	0.62 to 5	0.32
SF3B1 mutation (p.K700E)	1.1	0.4 to 3.1	0.82
NOTCH1 mutation (p.P2515fs*4)	2	0.92 to 4.3	0.106
Abbreviations: CLL, chronic lymphocytic leukemia; OS, overall survival; HR, hazard ratio; 95% CI, confidence interval.			

Artículo III. Arsenic trioxide synergistically potentiates the cytotoxic effect of fludarabine in chronic lymphocytic leukemia cells by further inactivating the Akt and ERK signaling pathways

A pesar de la gran variedad de terapias actualmente disponibles para la LLC, muchos pacientes no responden al tratamiento. Por tanto, es necesario seguir investigando las alteraciones moleculares de los pacientes refractarios, así como los mecanismos de resistencia implicados.

En este trabajo, se realizaron ensayos *in vitro* en células provenientes de un total de 35 pacientes con LLC, con 21 muestras de pacientes recién diagnosticados y 14 de pacientes en recaída, para analizar diferentes combinaciones de trióxido arsénico (ATO, 1 μ M) y fludarabina (1, 3 y 5 μ M). Se detectó una interacción sinérgica entre ATO (1 μ M) y fludarabina (5 μ M) que redujo significativamente el efecto citotóxico mediante esta combinación, a diferencia del efecto de los fármacos individuales. Además, ATO potenció el efecto de la fludarabina, en pacientes que no respondieron a este fármaco en los ensayos *in vitro*. El estudio de los mecanismos celulares implicados en esta interacción sinérgica, mostró que la combinación estudiada de ATO y fludarabina, disminuyó la expresión de Akt y ERK fosforilados, así como también los ratios de Mcl-1/Bim y Bcl-2/Bax. Adicionalmente, esta combinación disminuyó parcialmente la resistencia del microambiente en los co-cultivos con estroma que se realizaron.

En conclusión, los resultados que se han obtenido utilizando bajas concentraciones de ATO, muestran que la investigación de esta combinación sinérgica y de los mecanismos asociados, contribuye a la investigación de nuevas vías celulares en pacientes refractarios.



Arsenic trioxide synergistically potentiates the cytotoxic effect of fludarabine in chronic lymphocytic leukemia cells by further inactivating the Akt and ERK signaling pathways

Carol Lozano-Santos ^{a,1}, Irene Amigo-Jiménez ^{b,1}, Sara Nova-Gurumeta ^a,
Nuria Pérez-Sanz ^a, Angeles García-Pardo ^{b,*}, José A. García-Marco ^{a,**}

^a Molecular Cytogenetics Unit, Hematology Department, Hospital Universitario Puerta de Hierro-Majadahonda and IDIPHIM, Madrid, Spain

^b Cellular and Molecular Medicine Department, Centro de Investigaciones Biológicas, Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC), Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:
Received 28 March 2015
Available online xxx

Keywords:
CLL
Arsenic trioxide
Fludarabine
Synergistic effect
Combined therapies
Survival pathways

ABSTRACT

CLL remains an incurable disease, making it crucial to continue searching for new therapies efficient in all CLL cases. We have studied the effect of combining arsenic trioxide (ATO) with fludarabine, a frontline drug in CLL. We have found a synergistic interaction between 1 μ M ATO and 5 μ M fludarabine that significantly enhanced the cytotoxic effect of the individual drugs. Importantly, ATO sensitized fludarabine-resistant cells to the action of this drug. The mechanism behind this effect included the downregulation of phospho-Akt, phospho-ERK, and the Mcl-1/Bim and Bcl-2/Bax ratios. The combination of ATO and fludarabine partially overcame the survival effect induced by co-culturing CLL cells with stromal cells. Therefore, low concentrations of ATO combined with fludarabine may be an efficient therapeutic strategy in CLL patients.

© 2015 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Chronic lymphocytic leukemia (CLL) is characterized by the accumulation of CD5⁺ B-lymphocytes in peripheral blood and lymphoid tissues [1,2]. Albeit being a common type of leukemia, CLL remains incurable. Current therapies include the use of the purine analogue fludarabine, alone or combined with anti-CD20 monoclonal antibodies or kinase inhibitors [3–5]. Although these treatments control the disease in many cases, patients carrying bad prognostic markers (del17p13, unmutated IgHv) do not respond well to therapy, making it crucial to continue searching for new compounds, efficient in CLL patients who have indication for treatment.

Arsenic trioxide (ATO) is a successful treatment for acute promyelocytic leukemia and it is being trialed for its possible use in other hematologic and non-hematologic malignancies, generally in combined therapies [6–8]. We and others have shown that ATO, at 2–4 μ M concentration or higher, effectively induces *in vitro* apoptosis of CLL cells, including those cases with unfavorable prognosis [9–11]. It is not known whether the combination of low doses of ATO with the frontline therapeutic agent fludarabine, could be an efficient treatment for CLL, particularly in those cases with known resistance to fludarabine. In the present report we show that 1 μ M ATO synergistically interacts with fludarabine and enhances the cytotoxic effect of fludarabine on all CLL cases studied. We further show that this is due to the down-regulation of important survival pathways and that the combination of ATO and fludarabine partially overcomes the CLL cell survival effect induced by stroma.

2. Materials and methods

2.1. Patients, cells and cell cultures

Approval was obtained from the Hospital Puerta de Hierro and the CSIC Bioethics Review Boards for these studies. All patients

* Corresponding author. Centro de Investigaciones Biológicas, Ramiro de Maeztu 9, 28040 Madrid, Spain.

** Corresponding author. Hematology Department, Hospital Universitario Puerta de Hierro-Majadahonda, Manuel de Falla 1, 28222 Majadahonda, Madrid, Spain.

E-mail addresses: agarciapardo@cib.csic.es (A. García-Pardo), jagarciam@aehh.org (J.A. García-Marco).

¹ These authors contributed equally to this work.

² These two senior authors contributed equally to this work.

signed an informed consent before blood was drawn. B-lymphocytes were purified from the 35 CLL samples listed in Table 1 by centrifugation, using Ficoll gradient (Rafer, S.L. Zaragoza, Spain). The resulting B cell population was >90% CD19⁺, determined on a BD FACScalibur flow cytometer (San Jose, CA, USA). The human stromal cell lines HS-5 (fibroblastoid) and HS-27A (epithelioid) [12] were purchased from ATCC (Manassas, VA, USA) and cultured in RPMI/10% FBS. For CLL-stromal cell co-culture, stromal cells were seeded onto gelatin-coated wells for 4–6 h and stimulated with 15–20 ng/ml TNF α overnight at 37 °C, 5% CO₂. CLL cells were added to the confluent stromal cell monolayers or cultured in suspension for comparison. After 2 h at 37 °C, 1 μ M ATO, 5 μ M fludarabine, both drugs together, or vehicle was added and cells further incubated for 48 h. CLL cells were gently collected with culture medium for further analyses.

2.2. Antibodies and reagents

Rabbit polyclonal antibodies (RpAbs) to Mcl-1 (sc-819), Bax (sc-526) and mouse monoclonal Ab (mAb) to Bcl-2 (sc-509) were from Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA). RpAb to Bim (559685) was from BD Pharmingen (Franklin Lakes, NJ). Anti-vinculin mAb (V9131) was from Sigma–Aldrich (St. Louis, MO). Anti-phospho-Akt (Thr308) and phospho-ERK1/2 (Thr202/Tyr204) RpAbs were from Cell Signaling Technology Inc. (Beverly, MA). HRP-labelled Abs to rabbit or mouse immunoglobulins were from Dako (Glostrup, Denmark). Arsenic trioxide (ATO) and fludarabine were from Sigma–Aldrich.

Table 1
Clinical characteristics of CLL patients.

Patient	Sex/Age	Stage ^a	IGHV status	CD38/ZAP70 ^b	TP53	ATM	BIRC3	SF3B1	NOTCH1	11q	Therapy
P1	Male/57	A/I	M	–/ND	ND/del-	UM	UM	UM	UM	del-	No
P2	Female/54	A/I	M	–/ND	WT/del-	UM	UM	UM	UM	del-	No
P3	Male/67	B/I	UM	–/+	WT/del-	UM	M	UM	UM	del-	No
P4	Male/67	A/I	UM	–/+	WT/del-	UM	UM	UM	UM	del-	No
P5	Male/54	A/I	M	–/+	ND/del-	UM	M	UM	UM	del-	No
P6	Male/43	B/I	UM	–/+	WT/del-	UM	UM	UM	UM	del-	No
P7	Female/53	A/I	UM	–/+	WT/del-	UM	UM	UM	UM	del-	No
P8	Female/52	A/I	M	ND/ND	ND/del-	UM	UM	UM	UM	del-	No
P9	Male/58	A/I	UM	–/+	ND/del-	UM	UM	UM	UM	del+	No
P10	Male/74	A/I	M	–/+	ND/del-	UM	M	UM	UM	del-	No
P11	Female/42	B/I	M	–/+	WT/del-	UM	UM	UM	UM	del-	No
P12	Female/59	A/I	M	–/+	WT/del-	M	UM	UM	UM	del-	No
P13	Male/73	A/I	UM	–/+	M/del-	M	UM	UM	UM	del-	No
P14	Male/57	B/I	UM	–/+	WT/del-	UM	UM	UM	UM	del-	No
P15	Male/64	B/I	UM	–/ND	M/del-	ND	ND	UM	UM	del-	No
P16	Female/55	B/I	M	–/+	M/del-	ND	ND	UM	UM	del-	No
P17	Male/47	A/I	ND	–/+	WT/del-	ND	ND	UM	UM	del-	No
P18	Male/75	A/I	ND	–/+	ND/del-	ND	ND	UM	UM	del-	No
P19	Female/72	A/I	M	–/+	WT/del-	UM	UM	UM	UM	del-	No
P20	Female/69	B/I	ND	–/+	ND/del-	ND	ND	UM	UM	del+	No
P21	Male/65	A/II	ND	–/ND	ND/del-	ND	ND	ND	ND	del-	No
P22	Female/72	A/I	M	–/+	WT/del-	UM	UM	UM	UM	del-	CH
P23	Male/44	B/I	UM	–/+	M*/del-	UM	UM	UM	UM	del-	F
P24	Female/68	A/I	UM	–/+	WT/del-	UM	UM	UM	UM	del-	CH
P25	Female/67	A/II	UM	–/ND	WT/del-	UM	UM	UM	UM	del-	FC
P26	Female/65	A/I	M	–/+	M/del-	UM	UM	M	UM	del-	Benda
P27	Male/50	A/I	M	–/+	ND/del-	UM	UM	UM	UM	del-	FCR + Rm
P28	Male/68	A/I	M	–/+	WT/del-	UM	UM	M	ND	del-	FC
P29	Female/53	A/I	UM	–/ND	M*/del-	UM	UM	M	UM	del-	FC
P30	Male/46	A/I	UM	–/+	WT/del-	UM	UM	UM	M	del-	FC
P31	Male/49	A/I	UM	–/+	WT/del-	M	UM	UM	M	del+	CH
P32	Male/46	A/II	M	–/+	WT/del-	M	UM	UM	M	del-	FC-Alem
P33	Male/64	B/I	UM	–/ND	WT/del-	M	M	UM	UM	del+	FC
P34	Male/69	B/I	UM	–/+	ND/del-	UM	UM	UM	UM	del+	FCR
P35	Male/65	A/I	UM	–/+	WT/del-	ND	ND	UM	UM	del-	F

IGHV, immunoglobulin heavy variable gene; WT, wild type; M, Mutated; M*, acquired mutation; UM, unmutated; CH, Chlorambucil; F, Fludarabine; Benda, Bendamustine; FC, Fludarabine + Cyclophosphamide; FCR, Fludarabine + Cyclophosphamide + Rituximab; Rm, Rituximab maintenance; Alem, Alemtuzumab; ND, Not determined.

^a Clinical stage according to references [1,2].

^b The coexpression of CD38 and ZAP-70 has clinical prognostic value [1,2].

2.3. Analysis of cell viability

2 × 10⁵ CLL cells, cultured for 48 h in suspension or with stroma, and with or without drugs, were suspended in 300 μ l binding buffer (Immunostep, Salamanca, Spain) containing 1 μ l FITC-Annexin V and 1.5 μ g/ml propidium iodide (PI). Cell viability was determined using a five-color flow cytometer (FC 500; Beckman Coulter Inc, Fullerton, CA, USA). Data were analyzed using the CompuSyn software (BioSoft, Cambridge, UK), which allows the calculation of the combination index based on the algorithm of Chou and Talalay [13]. Combination index values <1 indicate synergism, values = 1 indicate additivity, and >1, antagonism.

2.4. Western blotting

These assays were performed exactly as previously described [11]. Protein bands were developed using the enhanced chemiluminescent detection method (GE Healthcare Europe GmbH, Barcelona, Spain) and quantitated using the MultiGauge V3.0 program (Fujifilm Global Lifescience, Düsseldorf, Germany). Protein load was corrected using vinculin as internal standard.

2.5. Mutational analysis

ATM (exons 2–63) and BIRC3 genes (exons 6–9) were analyzed by High-resolution melting (HRM) analysis using the LightCycler 480 platform (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) and Sanger sequencing using the BigDye Terminator Chemistry and an

ABIPrism 3130 automated DNA sequencer (Applied Biosystems, Foster City, CA). NOTCH1 (p.P2515fs*4) and SF3B1 genes (p.K700E) were studied by qbiomarker somatic mutation PCR assay (SABiosciences, Qiagen, Hilden, Germany) using 7500 RT-PCR (Applied Biosystems) [14].

2.6. Statistical analyses

Statistical significance of the data was determined using the two-tailed Student's *t*-test. A *p* value of ≤ 0.05 was considered significant. Analyses were performed using the GraphPad InStat v3.06 software (GraphPad Software, San Diego, CA, USA).

3. Results

3.1. 1. ATO enhances the cytotoxic effect of fludarabine in CLL cells

To determine whether ATO enhanced the cytotoxic activity of drugs currently used for the treatment of CLL, CLL cells from previously untreated (UT, *n* = 14) or treated (T, *n* = 13) patients (Table 1) were incubated with 1 μ M ATO alone or combined with increasing doses of fludarabine. After 48 h, cell viability was measured by flow cytometry using Annexin V and PI. The average constitutive viability of these samples was 86% (UT patients) and 84% (T patients) and was normalized to 100. Fig. 1A shows for both cases that ATO alone had a limited effect, reducing viability by 25% and 21%, respectively. Fludarabine alone decreased viability in a dose-dependent manner leading to 50% (UT patients) and 51% (T patients) at 5 μ M concentration. The combination of ATO and fludarabine significantly increased their individual effect at all concentrations of fludarabine tested, resulting in 26% (UT patients) and 42% (T patients) at the highest dose of fludarabine tested.

We next analyzed whether the interaction of ATO and fludarabine was synergistic or additive by calculating the combination index using the CompuSyn software. In samples from UT patients, the interaction of both drugs was additive for 1 μ M fludarabine and synergistic for the higher concentrations of 3 and 5 μ M (Fig. 1B). However, in samples from T patients, the combination of ATO with 1 or 3 μ M fludarabine was synergistic while the combination with 5 μ M fludarabine was additive (Fig. 1B), reflecting the differential response of the two groups of patients.

To then determine whether ATO was able to sensitize fludarabine-resistant cells to the action of this drug, we selected samples from both UT (P3, P5, P9, P10, P11) and T patients (P23, P26, P27, P29, P31) that responded poorly to fludarabine. Fig. 1C shows that fludarabine alone was highly inefficient as at the highest concentration cell viability remained at 81% and 85%, respectively, for UT and T samples. Likewise, 1 μ M ATO alone rendered cell viability values of 77% and 86%, respectively, for UT and T samples. Combination of several doses of fludarabine with 1 μ M ATO significantly decreased cell viability at all points tested, reaching 36% (UT samples) and 69% (T samples) at 5 μ M fludarabine (Fig. 1C). For T samples, the most efficient combination was 1 μ M ATO/1 μ M fludarabine. The interaction of ATO and fludarabine in these groups of patients followed the same synergistic or additive pattern described above, except that for UT samples, the combination of 1 μ M ATO/1 μ M fludarabine was also synergistic (Fig. 1D). Altogether these results indicated that low concentrations of ATO potentiated the effect of fludarabine, both in UT and T samples, leading to increased cell death.

3.2. The combination of ATO and fludarabine down-regulates survival pathways in CLL cells

To gain some insights on the mechanisms accounting for the synergistic cytotoxic effect of ATO and fludarabine, we analyzed the

possible regulation of well-known molecules involved in CLL survival. CLL cells from several UT patients were treated with either 1 μ M ATO, 5 μ M fludarabine or both drugs together. After 48 h, cells were lysed and analyzed by Western blotting. Fig. 2 shows the results of two representative samples and the quantitation of all samples studied. As observed, the phospho-Akt kinase was not down-regulated by ATO or fludarabine alone, but it was reduced 1.9-fold by combining both drugs (Fig. 2A, B). Likewise, ATO or fludarabine alone decreased phospho-ERK levels 1.5-fold, but the combination of both drugs led to a significant 4.2-fold reduction (Fig. 2A, B).

We also analyzed the regulation of Bcl-2 family proteins, which are major players in survival/apoptosis [15]. The anti-apoptotic proteins Mcl-1 and Bcl-2 were clearly down-regulated when ATO and fludarabine were used together, although the effect was not statistically significant in the case of Mcl-1, compared to the effect of fludarabine alone (Fig. 2C). The pro-apoptotic members Bim and Bax were not modulated by ATO or fludarabine alone or combined (Fig. 2C). Because regulation of cell apoptosis/survival by Bcl-2 family proteins is determined by the balance of anti-apoptotic and pro-apoptotic members [15], we also measured the ratios of well-known partners of this family. Fig. 2D shows that the Mcl-1/Bim and Bcl-2/Bax ratios were significantly down-regulated by the combination of ATO and fludarabine, compared to the effect of the individual drugs. These results therefore indicated that ATO enhanced the effect of fludarabine by further inactivating kinases and Bcl-2 proteins involved in CLL cell survival.

3.3. The combination of ATO and fludarabine partially overcomes the CLL drug-resistance effect induced by stromal cells

Given the relevant role of the microenvironment in inducing survival pathways and drug resistance in CLL cells [16,17], we studied whether the synergistic combination of 1 μ M ATO and 5 μ M fludarabine overcame this resistance. CLL cells were cultured alone or in the presence of HS-5 or HS-27A stromal cells and treated with ATO, fludarabine or both drugs together. After 48 h CLL cell viability was determined by flow cytometry. The viability of control, untreated, cells in all cases was normalized to 100. In the absence of stroma, the combination of both drugs significantly enhanced the cytotoxic effect of ATO or fludarabine alone, reducing the average viability to 28% (Fig. 3A). Co-culturing with stromal cells clearly protected CLL cells to the individual action of ATO or fludarabine, rendering viability values of 80–90% for both types of stromal cells (Fig. 3B and C). Combining both drugs significantly reduced these percentages to 70% (HS-5 cells) and 74% (HS-27A cells), indicating that the synergistic interaction of ATO and fludarabine partially overcame the survival effect induced by stroma.

4. Discussion

CLL remains an incurable disease and current therapies and clinical trials mostly rely on the use of combined therapies [1–4]. ATO may be a good compound to use in these therapies, due to its demonstrated effectiveness in all CLL cases, regardless of their prognostic markers [9–11]. Indeed, a previous study showed that ATO, at 2–4 μ M, preferentially induced apoptosis in CLL samples from patients with unfavorable prognosis, including those that were resistant to fludarabine [9]. Using a different strategy, consisting in combining ATO and fludarabine, we now show for the first time that 1 μ M ATO was synergistic with certain concentrations of fludarabine and sufficient to sensitize fludarabine-resistant CLL cells to this drug. Interestingly, samples from previously untreated or treated patients responded well to this drug combination, although the effect on treated patients was moderate. Another

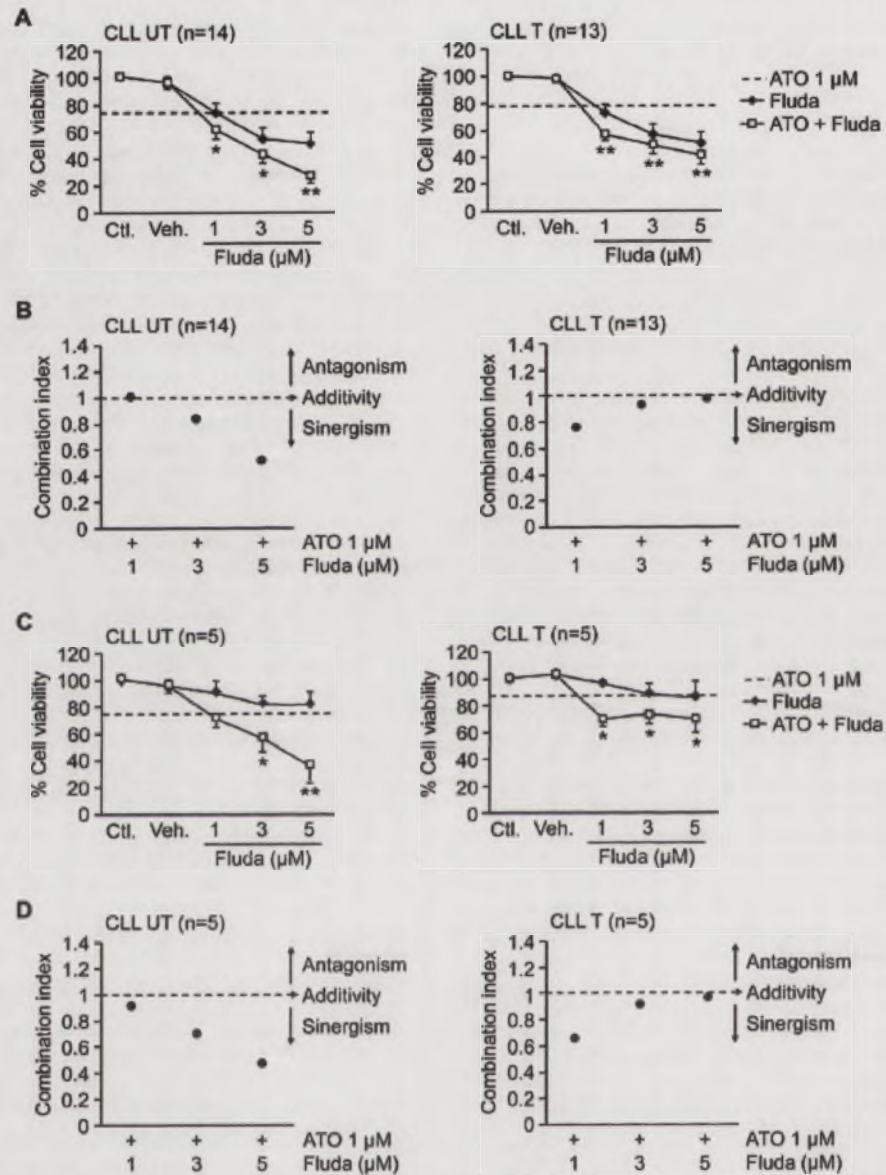


Fig. 1. Increased cytotoxicity against CLL cells by the combination of ATO and fludarabine. (A) 2×10^5 CLL cells from untreated (UT) or treated (T) patients were incubated with medium (control, Ctl), vehicle (Veh) or 1 μM ATO plus the indicated concentrations of fludarabine (Fluda). After 48 h, cell viability was determined by flow cytometry. Cell viability in the presence of 1 μM ATO alone (UT: 75%; T: 79%) is indicated by the dotted line. (B) Combination index values were calculated using the CompuSyn software. Graphs for UT and T samples represent the means of the indicated number of CLL samples, each with duplicate determinations. (C) CLL cells from UT and T patients that responded poorly to fludarabine were selected and treated with 1 μM ATO and the indicated concentrations of fludarabine. After 48 h cell viability was measured as explained. (D) Combination index analyses of the samples studied in (C) were calculated as above. *, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$.

difference between the two groups of patients was the dose of ATO at which synergism with fludarabine was observed. These differences probably reflect the more advanced disease (genetic modifications, clonal evolution, etc.) in the case of treated patients. In agreement with this, we mostly observed NOTCH1 and SF3B1 mutations, relevant for CLL pathology [18], within the group of treated samples (see Table 1).

Our results are in agreement with previous *in vitro* studies in which ATO was tested in combined therapies in several

malignancies. These include the combination with interferon- α for aggressive T-cell leukemia/lymphoma [19], or with phytosphingosine for myeloid leukemia cells [20]. ATO has also been tested in combination with kinase inhibitors, oxidative stress modulators and chemotherapeutic drugs, generally with good results [21,22]. Perhaps the best established is the combination of ATO and all-trans retinoic acid, already in clinical trials and shown to be extremely effective for the treatment of acute promyelocytic leukemia [23,24]. In line with these studies, we now report that the

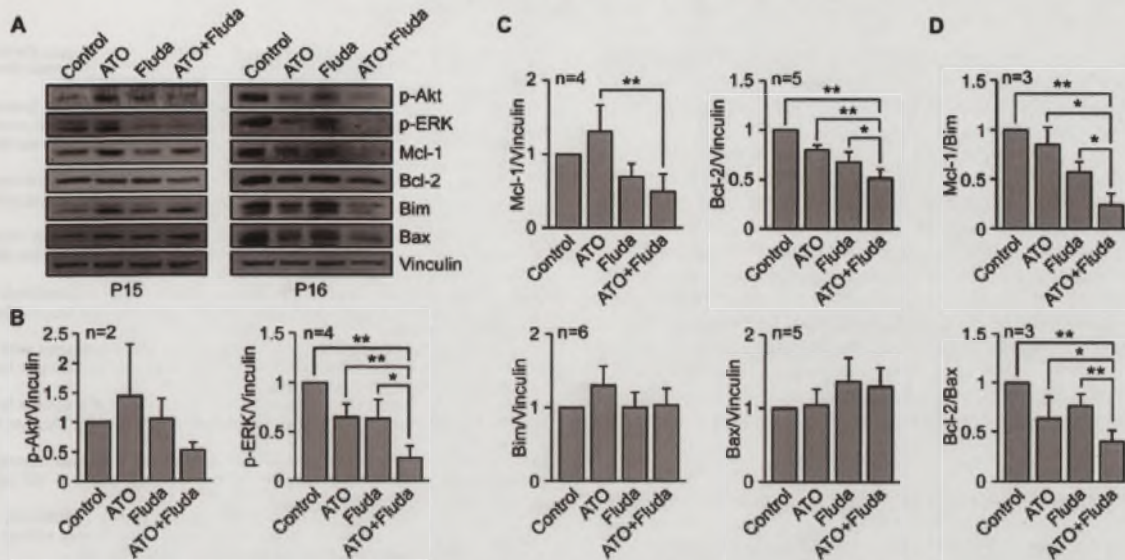


Fig. 2. Survival pathways affected by the combination ATO-fludarabine in CLL cells. (A) 10×10^6 CLL cells from two representative samples were treated with or without 1 μ M ATO, 5 μ M fludarabine or both drugs together for 48 h. Cells were lysed and lysates analyzed by Western blotting, using vinculin as internal standard. (B) Relative expression levels of phospho-Akt and phospho-ERK, quantitated by chemiluminescence after normalizing control values to 1. (C) Quantitation of the protein bands corresponding to the Bcl-2 family proteins shown in (A). (D) Quantitation of the indicated ratios. *, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$.

novel combination of very low concentrations of ATO and fludarabine may constitute a promising and effective alternative for the treatment of either naïve or relapsed/refractory patients with CLL.

Analysis of the possible mechanisms accounting for the enhanced cytotoxic effect of ATO + fludarabine revealed the involvement of the Akt and ERK pathways. Indeed, phosphorylation of both kinases was significantly down-regulated when both drugs were used together. Akt has been linked to the action of ATO since several reports have shown that inhibitors of this kinase increase the cytotoxic effect of ATO in myeloid and other cell types [25–27]. In the case of CLL, we have shown that 3 μ M ATO downregulated phospho-Akt, facilitating apoptosis [10]. Although the regulation of ERK by ATO appears to be more complex [28], it is clear from our present results that 1 μ M ATO combined with fludarabine

significantly dephosphorylates ERK. Therefore, the observed enhancement of CLL cell apoptosis when both drugs are present is likely due to the down-modulation of the Akt and ERK survival pathways.

Additional mechanistic insights were obtained by studying the possible regulation of some Bcl-2 family members known to be important for CLL cell survival [29]. Our results show that the expression of the anti-apoptotic proteins Mcl-1 and Bcl-2 clearly decreased upon treatment with ATO and fludarabine. Interestingly, Mcl-1 (and possibly Bcl-2) is a downstream target of Akt [30]. Additionally, the ratio with their corresponding pro-apoptotic partners Bim and Bax, was also downregulated by the combination of ATO and fludarabine. These results strongly suggest that the enhanced cytotoxicity observed upon combining ATO and

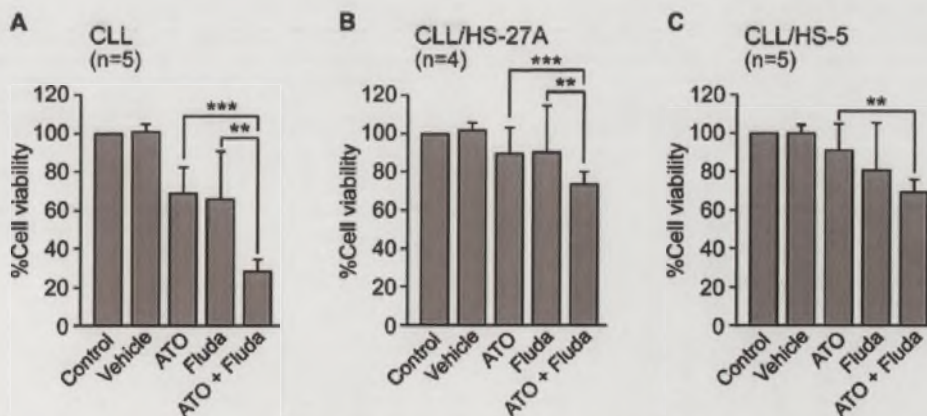


Fig. 3. The combination of ATO and fludarabine partially overcomes the survival effect of stroma. 2×10^5 CLL cells were incubated in suspension or with stromal cells, with or without 1 μ M ATO, 5 μ M fludarabine or both drugs together. After 48 h, CLL cells were recovered and their viability measured by flow cytometry. Cell viability of control, untreated, cells in each case was normalized to 100. *, $p \leq 0.05$; **, $p \leq 0.01$; ***, $p \leq 0.001$.

fludarabine involves down-regulation of crucial survival pathways. Importantly, modulation of these pathways was not achieved by the individual drugs, further demonstrating the synergistic action of ATO and fludarabine.

A crucial component to take into account when studying the action of drugs in CLL and other cells is the effect of the microenvironment, which activate survival signals on the malignant cells that favor drug resistance [16,17]. Using co-cultures of CLL and stromal cells we show in this report that the combination of ATO and fludarabine partially overcomes the survival effect of the stroma. Although these conditions would have to be further studied so that the stroma effect can be completely suppressed, our results are very encouraging, considering the low concentration of ATO employed in our study. In summary, our current findings indicate that ATO in combination with fludarabine may be an efficient and novel therapeutic strategy for all cases of CLL, including those with unfavorable prognosis.

Conflict of interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgments

This work was supported by grants SAF2012-31613 (AGP) and RTIC (Red Temática de Investigación Cooperativa en Cáncer) RD12/0036/0061 (AGP), from the Ministry of Economy and Competitiveness (MINECO), Spain; S2010/BMD-2314-Neoplasim (AGP) from the Comunidad de Madrid/European Union; and by a grant from the Fundación para la Investigación Biomédica Hospital Universitario Puerta de Hierro, Madrid (JAGM). CLS was supported by a grant from Roche Pharma and IAJ was supported by the Junta de Ampliación de Estudios program, JAEPre2010-00607, CSIC/EU, and by MINECO.

Transparency document

Transparency document related to this article can be found online at <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2015.04.007>.

References

- [1] L. Pleyer, A. Egle, T.N. Hartmann, R. Greil, Molecular and cellular mechanisms of CLL: novel therapeutic approaches, *Nat. Rev. Clin. Oncol.* 6 (2009) 405–418.
- [2] T. Zenz, D. Mertens, R. Küppers, et al., From pathogenesis to treatment of chronic lymphocytic leukaemia, *Nat. Rev. Cancer* 10 (2010) 37–50.
- [3] M. Hallek, Signaling the end of chronic lymphocytic leukemia: new frontline treatment strategies, *Blood* 122 (2013) 3723–3734.
- [4] F.T. Awan, J.C. Byrd, New strategies in chronic lymphocytic leukemia: shifting treatment paradigms, *Clin. Cancer Res.* 20 (2014) 5869–5874.
- [5] C. Chung, R. Lee, Ibrutinib, obinutuzumab, idelalisib, and beyond: review of novel and evolving therapies for chronic lymphocytic leukemia, *Pharmacotherapy* 34 (2014) 1298–1316.
- [6] K. Alimoghaddam, A review of arsenic trioxide and acute promyelocytic leukemia, *Int. J. Hematol. Oncol. Stem Cell. Res.* 8 (2014) 44–54.
- [7] L. Zhou, Jian Hou, G. Chi-Fung Chan, D. Man-Yuen Sze, Arsenic trioxide for non acute promyelocytic leukemia hematological malignancies: a new Frontier, *J. Blood Dis.* 1 (2014) 1018.
- [8] P.R. Subbarayan, B. Ardalan, In the war against solid tumors arsenic trioxide needs partners, *J. Gastrointest. Cancer* 45 (2014) 363–371.
- [9] O. Merkel, C. Heyder, D. Asslaber, et al., Arsenic trioxide induces apoptosis preferentially in B-CLL cells of patients with unfavourable prognostic factors including del17p13, *J. Mol. Med.* 86 (2008) 541–552.
- [10] J. Redondo-Muñoz, E. Escobar-Díaz, M. Hernández del Cerro, et al., Induction of B-chronic lymphocytic leukemia cell apoptosis by arsenic trioxide involves suppression of the PI3K/Akt pathway via JNK activation and PTEN upregulation, *Clin. Cancer Res.* 16 (2010) 4382–4391.
- [11] I. Amigo-Jiménez, E. Bailón, E. Ugarte-Berzal, et al., Matrix metalloproteinase-9 is involved in chronic lymphocytic leukemia cell response to fludarabine and arsenic trioxide, *PLoS One* 9 (2014) e99993.
- [12] A.B. Roeklein, B. Torok-Storb, Functionally distinct human marrow stromal cell lines immortalized by transduction with the human papilloma virus E6/E7 genes, *Blood* 85 (1995) 997–1005.
- [13] T.C. Chou, P. Talalay, Quantitative analysis of dose-effect relationships: the combined effects of multiple drugs or enzyme inhibitors, *Adv. Enzyme Regul.* 22 (1984) 27–55.
- [14] D. Rossi, M. Fangazio, S. Rasi, et al., Disruption of BIRC3 associates with fludarabine chemoresistance in TP53 wild-type chronic lymphocytic leukemia, *Blood* 119 (2012) 2854–2862.
- [15] P.E. Czabotar, G. Lessene, A. Strasser, J.M. Adams, Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy, *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 15 (2014) 49–63.
- [16] A.D. Ramsay, M. Rodríguez-Justo, Chronic lymphocytic leukaemia—the role of the microenvironment pathogenesis and therapy, *Br. J. Haematol.* 162 (2013) 15–24.
- [17] J.A. Burger, J.G. Gribben, The microenvironment in chronic lymphocytic leukemia (CLL) and other B cell malignancies: insight into disease biology and new targeted therapies, *Semin. Cancer Biol.* 24 (2014) 71–81.
- [18] S. Chiaretti, M. Marinelli, I. Del Giudice, et al., NOTCH1, SF3B1, BIRC3 and TP53 mutations in patients with chronic lymphocytic leukemia undergoing first-line treatment: correlation with biological parameters and response to treatment, *Leuk. Lymphoma* 55 (2014) 2785–2792.
- [19] K. Ishitsuka, J. Suzumiyu, M. Aoki, et al., Therapeutic potential of arsenic trioxide with or without interferon- α for relapsed/refractory adult T-cell leukemia/lymphoma, *Haematologica* 92 (2007) 719–720.
- [20] M.T. Park, Y.H. Kang, I.C. Park, et al., Combination treatment with arsenic trioxide and phytosphingosine enhances apoptotic cell death in arsenic trioxide-resistant cancer cells, *Mol. Cancer Ther.* 6 (2007) 82–92.
- [21] H. Yan, Y.C. Wang, D. Li, Y. Wang, et al., Arsenic trioxide and proteasome inhibitor bortezomib synergistically induce apoptosis in leukemic cells: the role of protein kinase C δ , *Leukemia* 21 (2007) 1488–1495.
- [22] S. Takahashi, Combination therapy with arsenic trioxide for hematological malignancies, *Anticancer Agents Med. Chem.* 10 (2010) 504–510.
- [23] F. Efficace, F. Mandelli, G. Avvisati, et al., Randomized phase III trial of retinoic acid and arsenic trioxide versus retinoic acid and chemotherapy in patients with acute promyelocytic leukemia: health-related quality-of-life outcomes, *J. Clin. Oncol.* 32 (2014) 3406–3412.
- [24] M.F. Arteaga, J.H. Mikesch, T.K. Fung, C.S. So, Epigenetics in acute promyelocytic leukaemia pathogenesis and treatment response: a transition to targeted therapies, *Br. J. Cancer* 112 (2015) 413–418.
- [25] A.M. Ramos, C. Fernández, D. Amrán, et al., Pharmacologic inhibitors of PI3K/Akt potentiate the apoptotic action of the antileukemic drug arsenic trioxide via glutathione depletion and increased peroxide accumulation in myeloid leukemia cells, *Blood* 105 (2005) 4013–4020.
- [26] G. Tabellini, A. Cappellini, P.L. Tazzari, et al., Phosphoinositide 3-kinase/Akt involvement in arsenic trioxide resistance of human leukemia cells, *J. Cell. Physiol.* 202 (2005) 623–634.
- [27] B.C. Bornhauser, L. Bonapace, D. Lindholm, et al., Low-dose arsenic trioxide sensitizes glucocorticoid-resistant acute lymphoblastic leukemia cells to dexamethasone via an Akt-dependent pathway, *Blood* 110 (2007) 2084–2091.
- [28] M.C. Estano, E. Calviño, E. de Blas, et al., 2-Deoxy-D-glucose cooperates with arsenic trioxide to induce apoptosis in leukemia cells: involvement of IGF-1R-regulated Akt/mTOR, MEK/JERK and LKB-1/AMPK signaling pathways, *Biochem. Pharmacol.* 84 (2012) 1604–1616.
- [29] A.C. Buggins, C.J. Pepper, The role of Bcl-2 family proteins in chronic lymphocytic leukaemia, *Leuk. Res.* 34 (2010) 837–842.
- [30] K. Balakrishnan, J.A. Burger, M. Fu, et al., Regulation of Mcl-1 expression in context to bone marrow stromal microenvironment in chronic lymphocytic leukemia, *Neoplasia* 16 (2014) 1036–1046.

Discusión

5. DISCUSIÓN

La LLC es una enfermedad con elevada heterogeneidad clínica y molecular, que hace difícil predecir el curso clínico de la misma y la respuesta al tratamiento. Los actuales factores de riesgo no son completamente eficaces para predecir la progresión y la quimio-refractariedad de los pacientes. Esto, unido a la resistencia frente a los fármacos, o en algunos casos, la excesiva toxicidad de los tratamientos, lleva a la necesidad de la identificación de nuevos marcadores con valor pronóstico que permitan seleccionar en etapas tempranas, a los pacientes que puedan beneficiarse del tratamiento. En la presente tesis doctoral, hemos analizado el impacto pronóstico de la variabilidad genética del gen *VEGFA*, el impacto mutacional de los genes *ATM*, *BIRC3*, *SF3B1* y *NOTCH1* implicados en la patogénesis de la LLC y combinaciones de fármacos para evaluar su potencial efecto sinérgico en pacientes con características moleculares de pronóstico adverso.

La relación entre los polimorfismos genéticos del gen *VEGFA* y la variación en su expresión, representa un área de estudio relevante al ser uno de los factores angiogénicos más potentes que se conocen. En nuestro trabajo, evaluamos por primera vez en una cohorte de población española, la variabilidad genética del gen *VEGFA* y su influencia tanto en la predisposición a la LLC como en el curso clínico de la enfermedad. En 239 pacientes recién diagnosticados y 183 individuos sanos, analizamos los polimorfismos rs699947 (-1540C>A), rs833061 (-460T>C), rs2010963 (405C>G), rs25648 (1032C>T) y rs3025039 (1689C>T). El análisis mostró una distribución similar en las frecuencias alélicas, genotípicas y haplotípicas entre la cohorte de pacientes con LLC y la serie control. Además, las frecuencias polimórficas concordaron con otras series, también de origen caucásico, publicadas en poblaciones de la misma etnia [362]. De nuestros resultados se deriva que las variantes analizadas no se asocian con ningún incremento de riesgo para desarrollar la enfermedad y por tanto, la diversidad genética del gen *VEGFA* no parece influenciar el desarrollo de la LLC en la población española. Góra-Tybor, en un estudio caso-control reciente de pacientes de LLC, detectó que el SNP rs3025039, al igual que en nuestros estudios,

presentó una distribución similar al grupo control. Sin embargo, detectaron que pacientes con el alelo C del SNP rs2010963 (405C>G) presentaban un riesgo incrementado en la predisposición para la LLC [276]. No obstante, los resultados en dicho trabajo fueron detectados en el límite del nivel de significación estadística, con un bajo número de polimorfismos analizados y además, no fueron realizados análisis haplotípicos entre las variantes, al no detectar ningún desequilibrio de ligamiento entre ellas. En otro estudio, el alelo T del SNP rs3025039 fue más frecuente en pacientes de LLC respecto a individuos sanos, con una asociación significativa en pacientes con estadios avanzados (Rai III/IV) [375]. Por tanto, aunque nosotros no hemos detectado diferencias entre el grupo de pacientes y el grupo control, para esclarecer el impacto de los polimorfismos de VEGFA en el desarrollo de la LLC, sería necesario el estudio de más variantes polimórficas en otras series. En este sentido, nuestro estudio caso-control aporta información no descrita previamente, siendo relevante al haber pocas publicaciones que evalúen la diversidad genética de VEGFA en la susceptibilidad a LLC [276, 375].

Con la finalidad de analizar en mayor profundidad la variabilidad genética de VEGFA, se evaluó el impacto de los polimorfismos del gen VEGFA en la cohorte de pacientes con LLC. El haplotipo ACG en homocigosis (genotipo ACG ^{+/+}) formado por los loci rs699947, rs833061 y rs2010963, afectó significativamente la supervivencia de los pacientes (SG media: 84.3 meses) en comparación con otros genotipos (SG media 173.1 meses) y de forma independiente a otros factores de riesgo, identificando al genotipo ACG ^{+/+} como un predictor relevante e independiente sobre la SG. En este sentido, otro estudio describió un efecto significativo entre estas variantes y la supervivencia de pacientes con leucemia mieloide aguda. En este caso, el análisis del haplotipo CTG de los SNPs rs699947/rs833061/rs2010963 y del genotipo CC del SNP rs3025039, mostró una influencia sobre la supervivencia de los pacientes, concretamente en la supervivencia libre de progresión (SLP), la supervivencia libre de eventos (SLE) y la SG [382].

Se ha descrito que la región flanqueante 5' del gen *VEGFA*, altamente variable, contiene polimorfismos con niveles de ligamiento elevados que dificultan la caracterización de este gen en la región promotora. Sin embargo, algunos de estos ligamientos se han preservado, asociándose con diferentes patologías y con un incremento en la expresión de *VEGFA* [377, 378]. De hecho, se ha descrito que los alelos A de rs699947 y C de rs833061 se han asociado con una inserción de 18 nucleótidos que potencialmente podría modificar la unión de otros factores al promotor del gen *VEGFA*, por tanto, esta alteración genética podría ser responsable del aumento de expresión de *VEGFA* [379] y una posible explicación molecular a nuestros resultados. De esta manera, una menor supervivencia asociada al genotipo $ACG^{+/+}$, podría relacionarse con un incremento de la angiogénesis como consecuencia de una mayor expresión génica asociada a este haplotipo. Por otra parte, aunque la mayoría de las funciones de *VEGFA* se centran en el endotelio vascular como factor pro-angiogénico, también desempeña diferentes funciones que favorecen la proliferación de las células tumorales. Así, una elevada expresión de *VEGFA* asociada al genotipo $ACG^{+/+}$ podría influenciar otros mecanismos que se han descrito implicados en la patogénesis y progresión de la LLC mediante la expresión de *VEGFA*, como el incremento de la resistencia a la apoptosis [294], la motilidad celular [297] o la influencia del microambiente [301-302].

Sin embargo, lo anteriormente expuesto, constituye una posible explicación biológica para los resultados detectados en este trabajo, por ello, sería necesario analizar los niveles de expresión de *VEGFA* en pacientes con genotipo $ACG^{+/+}$. Además, sería interesante evaluar la asociación de este genotipo en relación a mecanismos de resistencia asociados al microambiente tumoral y a la apoptosis de las células de LLC. En este sentido, en una fase posterior de este trabajo, se analizó si la presencia de alteraciones moleculares de pronóstico adverso, modificaban la respuesta apoptótica frente a determinados fármacos, evaluando también la resistencia ejercida por el microambiente tumoral. En este caso, no se identificaron suficientes muestras con el genotipo $ACG^{+/+}$ como para incluir esta variable en el análisis. Teniendo en cuenta esta

limitación del estudio, sería necesario realizar estos análisis en una cohorte de LLC con un mayor número de pacientes que presentaran este genotipo.

Para ampliar el conocimiento de la genética de *VEGFA* y su impacto en la supervivencia, se analizaron diferentes subgrupos de pacientes de LLC en base a diferentes parámetros clínicos y moleculares, mostrándose una asociación significativa entre el genotipo $ACG^{+/+}$ y el estado no mutado de los genes *IgVH* (*IgVH-UM*), un marcador molecular de gran relevancia en LLC por su correlación con un curso más agresivo de la enfermedad [60-65]. En relación a este resultado, Maffei y colaboradores [287] describieron un incremento de la vascularización en el grupo de pacientes con *IgVH-UM*, estableciendo una relación entre este fenotipo y un microambiente angiogénico más agresivo. Este estudio podría apoyar nuestros resultados sobre la asociación detectada entre el genotipo $ACG^{+/+}$ y el subgrupo de pacientes con *IgVH-UM*. Por otro lado, cuando se analizó la influencia del genotipo $ACG^{+/+}$ en la supervivencia de los pacientes con el estado mutacional de los genes *IgVH-M* y *UM*, sólo se detectó una menor SG en el grupo con *IgVH-M*. Del mismo modo, pacientes con el genotipo $ACG^{+/+}$ presentaron una menor supervivencia cuando se analizaron otras variables de pronóstico indolente como anormalidades genéticas de pronóstico favorable (deleción 13q de forma aislada) o de bajo riesgo (cariotipo normal y trisomía 12), estadio clínico A de Binet, expresión negativa de CD38 y edad temprana al diagnóstico. De forma destacada, estos resultados señalan una potencial utilidad clínica de los polimorfismos genéticos del gen *VEGFA* como factores predictivos en la detección de una menor supervivencia en pacientes con características indolentes, lo que permitiría afinar la clasificación de este grupo de pacientes dentro de la LLC. Además, nuestros resultados mostraron que la detección de los polimorfismos genéticos mediante la discriminación alélica por PCR a tiempo real, proporciona un método rápido y fácilmente reproducible, que debe tenerse en cuenta para su potencial uso en la práctica clínica.

Aunque en nuestro estudio, la presencia del genotipo $ACG^{+/+}$ no se correlacionó con una menor supervivencia en pacientes con características de pronóstico adverso,

esta observación pudo ser más aparente que real. Cuando se analizó el genotipo $ACG^{+/+}$ en subgrupos de pacientes con características de pronóstico adverso, el mayor efecto de estas alteraciones en la supervivencia, pudo enmascarar diferencias en la supervivencia asociada a este genotipo. Pepper y colaboradores [376], en contraste con nuestros resultados, detectaron un aumento de la expresión de VEGFA en células de LLC con altos niveles de CD38. Esta elevada expresión se asoció con un incremento en la expresión de la proteína anti-apoptótica Mcl-1 y con una disminución en la supervivencia de los pacientes con expresión positiva de CD38, un marcador de pronóstico desfavorable. Sin embargo, hemos detectado una distribución similar en los polimorfismos del gen *VEGFA* en pacientes con diferentes niveles de expresión de CD38, lo que sugiere que el incremento de expresión de VEGFA en este subgrupo podría no relacionarse con el perfil genético del gen *VEGFA*.

Para confirmar las diferencias detectadas en relación a la supervivencia, sería necesario analizar una cohorte independiente de pacientes, ya que no fue posible con el número de muestras disponibles durante esta fase del estudio. De esta manera, para validar nuestros resultados deberían realizarse un mayor número de estudios en otras cohortes de LLC. Además sería relevante, analizar la influencia de la variabilidad genética del gen *VEGFA* en otros grupos étnicos. Como se ha mencionado anteriormente, son muy pocos los estudios realizados en LLC que muestran cómo la variabilidad genética del gen *VEGFA* influye sobre los niveles de expresión y la patogénesis de la LLC [276, 375].

Las implicaciones del incremento de la vascularización en la médula ósea se han descrito en el pronóstico de enfermedades hematológicas [380, 381], lo que ha conducido al estudio del significado clínico de la genética del gen *VEGFA* en neoplasias como la leucemia mieloide crónica [383] y el linfoma no Hodgkin [385, 386], descritas en el artículo I de la presente tesis. Además, en un estudio caso-control reciente, el genotipo CT del SNP rs3025039, se asoció con un efecto aditivo relacionado con el riesgo a la leucemia mieloide crónica [384]. Por otra parte, las células de LLC presentaron una elevada expresión de VEGFR2 en suero, en comparación con los

individuos sanos [276], asociándose con linfocitosis, anemia severa, niveles elevados de $\beta 2$ -microglobulina, estadios avanzados y una menor supervivencia en pacientes con LLC [274, 281, 288]. Estos resultados apoyaron la importante función de la interacción VEGFA/VEGFR2 en el curso de la LLC, sugiriendo que la evaluación de los polimorfismos del gen *VEGFR2*, también debería tenerse en cuenta sobre el impacto pronóstico en la LLC.

Otras investigaciones han mostrado que la alteración de los factores pro-angiogénicos puede inhibir la densidad y el crecimiento de los vasos sanguíneos en el tumor, y que la combinación de agentes anti-angiogénicos con otros fármacos tuvo efectos sinérgicos para alcanzar tasas de respuesta completa en tumores sólidos. Los resultados del primer ensayo clínico evaluando la terapia anti-VEGF con Bevacizumab, un inhibidor de la angiogénesis que bloquea VEGF, indicaron una pérdida de eficacia en los pacientes de LLC en recaída o refractarios al tratamiento [387]. Sin embargo, una investigación posterior con Bevacizumab en experimentos *in vitro* con células de LLC [323], demostró por primera vez un incremento citotóxico significativo en combinación con Rituximab, Alemtuzumab y Rapamicina, comparado con el efecto de los fármacos individuales. Aunque estudios futuros deberán confirmar esos datos, la combinación de fármacos anti-VEGF con tratamientos convencionales podría representar una prometedora estrategia terapéutica en la LLC. En este sentido, los resultados que hemos obtenido sobre determinados polimorfismos genéticos del gen *VEGFA* y su influencia en la supervivencia, indican su utilidad potencial a nivel clínico que junto a otros parámetros, podrían emplearse como marcadores genéticos con impacto pronóstico en la LLC y como posibles marcadores de eficacia clínica con fármacos dirigidos contra VEGF o contra su receptor VEGFR, para prevenir la progresión de la leucemia [305].

Continuando con el análisis retrospectivo de marcadores pronósticos en la LLC, se analizó una cohorte de 118 pacientes al diagnóstico, con un mayor número de casos con delección 11q (40/118, 33.9%). En esta fase del estudio, se realizó un cribado molecular del gen *ATM* mediante HRM. Se detectaron 155 muestras que presentaban

potencialmente variantes genéticas. De ellas, 135 (87.1%) fueron confirmadas por secuenciación. La detección de un mayor número de muestras respecto a las confirmadas, puede indicar una sensibilidad mayor de la técnica HRM. El límite de detección del 6% de alelo mutado, que establecimos previamente, se mostró en consonancia con el límite detectado en un estudio reciente de detección mutacional mediante HRM [388], además, fue superior al límite de detección del 20% descrito para la secuenciación [389]. La heterogeneidad genética reportada en diferentes tipos de cáncer por estudios genómicos recientes [390, 391] y la presencia de mutaciones clonales y subclonales descritas en la LLC [392, 393], muestra la importancia de técnicas de mayor sensibilidad como el HRM, que permitan la detección de mutaciones durante la evolución clonal de la enfermedad.

En nuestro estudio detectamos que las mutaciones de los genes *ATM* y *BIRC3*, el estado mutacional de los genes IgVH-UM, el cariotipo complejo y el estadio clínico avanzado, se asociaron con la delección 11q, en consonancia con otros estudios descritos en la LLC [123, 394]. Además, de forma similar a un estudio previo, en el análisis no se detectó ninguna asociación significativa entre las mutaciones del gen *ATM* y el resto de variables clínicas y biológicas que se estudiaron [122]. Sin embargo, nuestros resultados mostraron que las mutaciones del gen *ATM* en pacientes con delección 11q de reciente diagnóstico, se asociaron de forma significativa e independiente con un riesgo de muerte mayor comparado a otros factores de riesgo desfavorable como, la delección 11q de forma aislada, genes IgVH-UM, edad superior a 65 años, estadio clínico avanzado y cariotipo complejo. Por otro lado, se detectó que las mutaciones de los genes *BIRC3*, *SF3B1* y *NOTCH1* estuvieron asociadas con otras variables pronósticas de riesgo adverso, de forma similar a otras investigaciones descritas en pacientes de LLC [160, 164, 395, 396]. Además, en nuestra cohorte de pacientes, las mutaciones del gen *BIRC3* (con y sin delección 11q) y las mutaciones de *SF3B1* y *NOTCH1*, no tuvieron influencia en la SLT y en la SG, cuando fueron detectadas al diagnóstico.

Cabe destacar, que son pocos los estudios que han examinado el impacto pronóstico de las mutaciones del gen *ATM* en una cohorte de pacientes de reciente diagnóstico con delección 11q [121, 395, 396]. De hecho, la mayoría de los estudios se han realizado en pacientes que, aunque no recibieron tratamiento previo, como consecuencia de haber progresado clínicamente, fueron seleccionados para recibir quimioterapia en primera línea de tratamiento, en el contexto del ensayo clínico LRF-CLL4 [122, 127, 394]. En este sentido, la importancia de los resultados obtenidos en nuestro estudio deriva de las características de la población estudiada, constituida por una cohorte consecutiva de pacientes recién diagnosticados, con un mayor número de pacientes con delección 11q y analizada durante un extenso tiempo de seguimiento (72 meses). Asimismo, en el análisis de la evaluación del estatus mutacional del gen *ATM*, incluimos el estudio de genes recientemente implicados en la patogénesis de la LLC como *BIRC3*, *SF3B1* y *NOTCH1* [159, 163, 164, 392].

Rose-Zerilli y colaboradores, describieron que en pacientes en progresión clínica y estudiados antes de recibir tratamiento de primera línea, las mutaciones monoalélicas del gen *ATM* (presentes de forma aislada) no tuvieron ningún impacto en la supervivencia. En contraste, los pacientes con mutación *ATM* en combinación con la delección 11q, mostraron un incremento significativo del riesgo de muerte similar al de los pacientes que presentaban sólo delección 11q o ninguna alteración (*ATM wild-type*) [127]. Sin embargo, el riesgo de muerte observado por los autores, fue aproximadamente cuatro veces menor respecto al que presentaron los pacientes con delección p53. Por otro lado, en un estudio multivariante reciente no se detectó ningún impacto en la SG de los pacientes con ambas alteraciones de *ATM* comparado con los pacientes con delección 11q [31]. Estos resultados se diferencian de nuestro estudio, donde hemos detectado que los pacientes con alteraciones bialélicas del gen *ATM* al diagnóstico, presentaron de forma significativa un riesgo de muerte similar al de los pacientes con delección p53, lo que es interesante resaltar ya que esta alteración molecular, junto con la mutación del gen *TP53*, presenta el fenotipo más agresivo en los pacientes con LLC [73, 139-141]. Estas diferencias podrían ser atribuibles a un mayor efecto de las alteraciones bialélicas del gen *ATM* en los pacientes estudiados al

diagnóstico. Así mismo, no se detectaron pacientes con ambas alteraciones del gen *ATM* que presentaran adicionalmente delección p53. Este hecho apoya nuestros resultados sobre el impacto pronóstico independiente de las mutaciones del gen *ATM* en los pacientes con delección 11q con respecto a los pacientes con delección p53.

En nuestra serie también se detectó que las mutaciones monoalélicas del gen *ATM*, presentes como única anormalidad genética, no tuvieron ningún efecto en la supervivencia, destacando que el tiempo medio de seguimiento de estos pacientes fue de 84 meses [rango 45-106 meses]. Además, en concordancia con un estudio publicado recientemente, nuestro análisis mostró que el impacto del doble hit en la alteración del gen *ATM* (mutación y delección 11q) no influyó significativamente la SLT [396]. De esta manera, nuestros resultados manifiestan cómo la heterogeneidad molecular de la LLC influye en la supervivencia de diferentes subgrupos de pacientes, indicando la importancia de la identificación de nuevos marcadores pronósticos en etapas iniciales, que permitan evaluar su impacto en la progresión de la enfermedad. Por otra parte, considerando la baja frecuencia de los casos con delección 11q y mutación de *ATM* en los pacientes de reciente diagnóstico, sería necesario realizar estudios adicionales que incluyeran un mayor número de muestras con anormalidades bialélicas del gen *ATM*.

En las células de LLC, las delecciones 11q son monoalélicas [125], y la pérdida de los alelos *ATM* debido a la delección 11q también incluye la pérdida de otros genes tales como el gen *BIRC3* localizado dentro de la región 11q [116, 129]. En nuestro estudio, las alteraciones bialélicas del gen *BIRC3* no tuvieron un impacto relevante sobre la supervivencia de los pacientes en el modelo multivariante. Posiblemente como consecuencia del efecto de otros marcadores genéticos que contribuyeron al pronóstico adverso de los pacientes con mutación en el gen *BIRC3* (7/7 pacientes tuvieron genes IgVH-UM, 6/7 tuvieron delección 11q y 3/7 mutación del gen *ATM*). Nuestros resultados están en consonancia con otro estudio reciente, donde la delección y/o mutación del gen *BIRC3* no tuvo un impacto en la supervivencia de pacientes en progresión [127]. Sin embargo, el mismo estudio observó que, en algunos casos con

deleción 11q, no se detectó deleción de *BIRC3*. Por lo tanto, las alteraciones del gen *BIRC3* al diagnóstico deberían ser confirmadas en otras series de pacientes con LLC para evaluar otros genes incluidos en esta región [116, 128].

La pérdida de la proteína ATM por la alteración bialélica del gen que la codifica, inhibe su función pro-apoptótica. Este hecho puede impedir que desarrolle una respuesta óptima a la quimioterapia convencional contribuyendo así, a la quimio-resistencia de las células de LLC. Se ha observado que, en pacientes con deleción 11q, la adición de anticuerpos anti-CD20 a la quimioterapia mejora la SLP en una media de 3 años [98]. Por lo tanto, en pacientes con deleción 11q, la identificación temprana de las mutaciones del gen *ATM* podría ser necesaria para la adecuada aplicación de quimio-inmunoterapia y para la elección de nuevas opciones terapéuticas dirigidas cuando se alcance la alteración bialélica del gen *ATM*.

En el presente estudio, los resultados obtenidos demuestran la relevancia de la identificación de determinadas variantes genéticas de *VEGFA* y de mutaciones del gen *ATM*, en el pronóstico de pacientes recién diagnosticados. Por otra parte, diversos componentes celulares implicados en el proceso de apoptosis que conforman el microambiente tumoral [228-230], se han asociado a la resistencia de diferentes fármacos [194-196, 206] y a un pronóstico adverso [192-193] en los pacientes con LLC. Además, las terapias actuales apoyan el uso de terapias combinadas como la estrategia más adecuada para el tratamiento en la LLC [8, 399, 400, 401]. De esta manera, hemos analizado combinaciones de fármacos para explorar diferentes vías biológicas implicadas en los mecanismos de resistencia y evaluar su interacción en respuesta a características moleculares de pronóstico adverso.

Estudios previos mostraron que la forodesina [336, 340] y el trióxido de arsénico (ATO) [354, 356] de forma individual, presentaron una eficaz actividad antitumoral *in vitro* en células de pacientes con LLC, por lo que fue una de las combinaciones seleccionadas para el estudio. Los resultados obtenidos de los ensayos dosis-respuesta *in vitro*, mostraron un tipo de interacción aditiva tanto en muestras de

pacientes sin tratamiento previo como en muestras de pacientes en recaída. Además, al analizar el efecto citotóxico de los fármacos en función de las alteraciones moleculares de los pacientes, no se detectaron diferencias en la respuesta a los fármacos individuales o a la combinación. Estos resultados indicaron que la interacción de ambos fármacos en células de LLC, ejerce un efecto moderado sobre los mecanismos de supervivencia celular, destacando que esta interacción no se había descrito previamente en células de LLC. Sin embargo, nuestros resultados fueron diferentes a los publicados en un estudio previo con forodesina que, como agente único o en combinación con Bendamustina o Rituximab, fue altamente eficaz en células de LLC de pacientes refractarios a fludarabina, independientemente de los niveles de expresión de ZAP-70, CD38 y delección en los genes *TP53* y/o *ATM* [340]. Por el contrario, en un ensayo clínico realizado con forodesina en pacientes refractarios a fludarabina, los resultados de dicho estudio fueron limitados [341]. La forodesina fue capaz de eliminar selectivamente células de LLC en suspensión, sin embargo su actividad citotóxica disminuyó por la resistencia del microambiente celular [342]. Por otro lado, con los resultados moderados que obtuvimos estudiando la combinación de ATO y forodesina, no consideramos relevante el profundizar en las vías apoptóticas asociadas a este efecto.

ATO representa un buen componente para el uso de terapias combinadas, debido a su demostrada efectividad en todos los casos de LLC realizados *in vitro*, independientemente de sus marcadores pronósticos [402-404]. Además, un estudio previo mostró que ATO en concentraciones de 2 a 4 μM , preferencialmente induce apoptosis en muestras de pacientes con pronóstico desfavorable, incluyendo aquellos que fueron resistentes a fludarabina [402]. De esta manera, teniendo en cuenta los estudios previos que apoyaban la eficacia *in vitro* de ATO en células de LLC, estudiamos una estrategia diferente para analizar los mecanismos de resistencia mediante la combinación de ATO y fludarabina.

De forma destacada, nuestros resultados mostraron por primera vez que 1 μM de ATO alcanzó un efecto sinérgico en determinadas concentraciones de fludarabina y

además, estas combinaciones fueron suficientes para sensibilizar a células de LLC resistentes a este fármaco. Asimismo, cabe destacar que tanto las muestras provenientes de pacientes no tratados como las de los pacientes en recaída, respondieron a esta combinación, aunque el efecto en estos últimos fue moderado. Otra diferencia que detectamos entre los dos grupos de pacientes analizados, fue la dosis de ATO a la que fue detectado el efecto sinérgico en combinación con fludarabina. Las diferencias en el efecto citotóxico entre ambos grupos, probablemente sea consecuencia de diferencias a nivel molecular que proporcionen una ventaja proliferativa a estas células. Esto fue observado cuando detectamos un mayor número de mutaciones de pronóstico adverso en el grupo de pacientes en recaída. Particularmente en nuestra serie, la mayoría de pacientes que no respondieron a fludarabina en los ensayos *in vitro*, presentaron mutaciones del gen *TP53*, lo que explicaría la refractariedad de los pacientes a este fármaco [107, 141]. Estos resultados estuvieron en concordancia con otros estudios publicados, que mostraron un aumento de las alteraciones moleculares que hemos estudiado, entre otras, en pacientes refractarios de LLC [159, 163, 164, 405-407].

La fludarabina induce la expresión de proteínas pro-apoptóticas de manera p53 dependiente, por tanto la pérdida de funcionalidad de este gen o de su principal activador ATM, altera la muerte celular por el efecto citotóxico del fármaco [142, 143]. De hecho, en nuestra serie, uno de los pacientes refractarios que no mostró alteración del gen *TP53*, presentó inactivación bialélica del gen *ATM*. Por otro lado, ATO a diferencia de fludarabina, presenta un efecto citotóxico no dependiente de p53, por tanto, la interacción de ambos fármacos representa un mecanismo de acción interesante para ser investigado en pacientes refractarios.

Los resultados que hemos obtenido por la acción citotóxica de ATO, estuvieron en concordancia con estudios previos *in vitro*, en los que ATO fue usado en terapias combinadas para otras neoplasias hematológicas, como se describe en el artículo III de este estudio [408-413]. Por otro lado, cuando estudiamos el efecto citotóxico de ATO y fludarabina, se describe por primera vez que una baja concentración de ATO en

combinación con fludarabina incrementó el efecto citotóxico en las células de LLC de pacientes al diagnóstico y refractarios, en comparación al efecto individual de los fármacos.

Con el fin de analizar los posibles mecanismos biológicos que explican el mayor efecto citotóxico de la combinación de ATO y fludarabina, se estudiaron dos quinasas importantes en la supervivencia de las células de LLC, concretamente ERK y Akt [216, 217, 228]. Hemos detectado que la fosforilación de ambas quinasas fue significativamente menor cuando ambos fármacos fueron administrados juntos. En un estudio previo, se demostró que en células de LLC, 3 μ M de ATO disminuyó los niveles de Akt fosforilado, favoreciendo la apoptosis [403]. De forma similar, en varias publicaciones Akt se correlaciona con la acción de ATO, donde inhibidores de esta quinasa incrementan el efecto citotóxico de ATO en células mieloides y en otros tipos celulares [414-416]. Aunque la regulación de ERK por ATO parece ser más compleja [417], se deduce claramente de nuestros resultados que 1 μ M de ATO combinado con fludarabina, puede disminuir significativamente los niveles de ERK fosforilado. Por lo tanto, es factible que el incremento apoptótico que se observó por la acción combinada de ambos fármacos en las células tumorales, fuera consecuencia de una desregulación de las vías de supervivencia asociadas a Akt y ERK. Estos resultados están en consonancia con diferentes estudios en LLC que describen la implicación de estas quinasas en mecanismos de resistencia a la apoptosis, tanto espontánea como inducida por agentes citotóxicos [418-421].

Así mismo, para obtener un mayor conocimiento de los mecanismos implicados en la acción de estos fármacos, se estudió la posible regulación de algunos miembros de la familia Bcl-2 conocidos por su implicación en mecanismos de supervivencia en la LLC. En este sentido, nuestros resultados mostraron que la expresión de las proteínas anti-apoptóticas Mcl-1 y Bcl-2, claramente disminuyen con el tratamiento combinado de ATO y fludarabina. Cabe destacar que Mcl-1 (y probablemente también Bcl-2) es una diana localizada en la cadena de señalización de Akt [422]. Además, el ratio con sus correspondientes proteínas pro-apoptóticas Bim y Bax, también disminuyeron por

la acción de ATO con fludarabina. En conjunto, estos resultados sugieren que el incremento de la citotoxicidad observada en la combinación de ambos fármacos, afecta la regulación de vías críticas en la supervivencia celular. Cabe destacar que estas proteínas se caracterizan por ser importantes reguladores en el proceso de apoptosis y por su asociación con pronóstico adverso y quimiorrefractoriedad en la LLC [185, 192-196, 423]. De hecho, la modulación de estas vías no fue alcanzada por los fármacos individuales, lo que demuestra aún más la eficacia sinérgica de ATO y fludarabina. Además, nuestros resultados son comparables a publicaciones previas que han mostrado que ATO disminuyó los niveles de Mcl-1 en otras leucemias, como la leucemia mieloide aguda [424] o el mieloma múltiple [425], además de ser capaz de inducir proteínas anti-apoptóticas como Bax o Bim [426, 427].

La interacción entre las células de LLC y el microambiente tumoral, es importante por proporcionar señales de crecimiento y supervivencia que favorecen la resistencia frente a los fármacos [225, 226, 401]. Diferentes estudios muestran el papel fundamental del microambiente de la médula ósea, concretamente, se ha descrito que cultivos de las células de LLC con BMSCs, incrementan la resistencia apoptótica [230, 246, 247]. De esta manera, para evaluar la combinación de ATO y fludarabina, se realizaron co-cultivos de células de LLC con células estromales. Se mostró que la combinación estudiada, actuó parcialmente sobre la resistencia que ejercen las células del estroma sobre las células de LLC. Un estudio reciente mostró que el cocultivo de células de LLC con células estromales induce la activación, en las células leucémicas, de diferentes vías entre las que se localizan PI3K/Akt y MEK/ERK. Además, en este mismo estudio mediante inhibidores específicos se mostró que PI3K y Akt, entre otros, pero no ERK, estuvieron implicados en la resistencia a ATO inducida por células del estroma [428]. Sin embargo, otro estudio demostró que ERK estuvo implicado en la resistencia de las células de LLC a fludarabina en condiciones similares al microambiente tumoral [429]. Frente a estas investigaciones que han estudiado el efecto de ATO y fludarabina de forma individual en la LLC, sería necesario realizar ensayos con inhibidores específicos de Akt y ERK para estudiar los mecanismos de resistencia en la combinación de ambos fármacos. Aunque nuestros resultados sobre ATO y fludarabina

no muestren una fuerte acción sobre la resistencia del estroma, estas condiciones podrían ser estudiadas más ampliamente, teniendo en cuenta la baja concentración de ATO que se ha empleado en nuestro estudio.

En resumen, en nuestro trabajo hemos estudiado diferentes alteraciones moleculares y su influencia en el pronóstico de la LLC. Mediante un estudio caso control, evaluamos por primera vez en una cohorte de población española, la diversidad genética del gen *VEGFA* y su influencia en la predisposición, pronóstico y fisiopatología de la enfermedad. También hemos sido de los pocos trabajos en describir en etapas tempranas de la LLC, el impacto de las mutaciones del gen *ATM* en el pronóstico de pacientes con delección 11q, destacando que hemos detectado que la inactivación bialélica del gen *ATM* conduce a un pronóstico adverso similar al de los pacientes con delección p53. Además, mostramos por primera vez, como la combinación de bajas concentraciones de ATO con fludarabina, alcanzan un fuerte efecto sinérgico, sensibilizando a células resistentes, permitiendo investigar nuevas vías celulares en pacientes con LLC refractaria y alteraciones moleculares de pronóstico adverso. En conjunto, nuestros resultados muestran la importancia de estudiar nuevas combinaciones de fármacos que sean de utilidad en la investigación de vías celulares implicadas en la resistencia y quimio-refractariedad. Además, se identificaron marcadores pronósticos potencialmente útiles, que junto a otros parámetros, podrían ser beneficiosos en la práctica clínica para el establecimiento de diferentes subgrupos de riesgo, la elección del tratamiento y la mejora de la calidad de vida del paciente.

The first part of the paper discusses the importance of the study of the history of the United States. It is argued that a knowledge of the past is essential for a full understanding of the present. The author then goes on to discuss the various factors that have shaped the development of the United States, including the role of the government, the influence of the economy, and the impact of the culture. The paper concludes by suggesting that a study of the history of the United States is not only a valuable academic exercise, but also a necessary one for anyone who wishes to understand the world in which we live.

5. C

6. D

7. E

8. B

9. C

10. D

11. E

12. A

13. B

14. C

15. D

16. E

17. A

18. B

19. C

20. D

21. E

22. A

23. B

24. C

25. D

26. E

27. A

28. B

29. C

30. D

31. E

Conclusiones

Conclusions

6. CONCLUSIONES

1. La diversidad genética del gen *VEGFA*, para las variantes analizadas, no interviene en el desarrollo de la LLC en la población española.
2. El genotipo ACG^{+/+}, formado por las variantes rs699947/rs833061/rs2010963 del gen *VEGFA*, es un marcador pronóstico adverso de supervivencia, independiente de otros parámetros y con capacidad para diferenciar al diagnóstico, subgrupos de diferente pronóstico clínico, en pacientes con parámetros de curso indolente.
3. La inactivación bialélica del gen *ATM* al diagnóstico, se asocia significativamente con un riesgo mayor de muerte comparado con otros factores de riesgo adverso clásicamente establecidos como la edad, estado IgVH-no mutado, estadio clínico avanzado y cariotipo complejo.
4. La detección de mutaciones del gen *ATM* en pacientes con delección 11q en etapas iniciales de la enfermedad, identifica un subgrupo de pacientes con una supervivencia menor similar a la de los pacientes con delección p53.
5. Las alteraciones del gen *BIRC3*, *SF3B1* y *NOTCH1* detectadas al diagnóstico, no tienen impacto sobre la progresión clínica y la supervivencia.
6. La combinación de trióxido de arsénico y forodesina presenta una interacción de tipo aditivo en la evaluación del efecto citotóxico en cultivos *in vitro* de células de pacientes con LLC.
7. El trióxido de arsénico a bajas concentraciones potencia sinérgicamente el efecto citotóxico de fludarabina tanto en pacientes de reciente diagnóstico como en pacientes en recaída con alteraciones moleculares de pronóstico adverso.
8. El efecto citotóxico del trióxido de arsénico induce en células de LLC refractarias a fludarabina una menor activación de Akt y ERK, de las proteínas anti-apoptóticas Mcl-1 y Bcl-2 y una disminución parcial de la resistencia inducida por el estroma, corroborando la acción de esta combinación en mecanismos de supervivencia en pacientes refractarios.

Bibliografía

Bibliography

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Chiorazzi N, Rai KR, Ferrarini M. Chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2005;352:804-15.
2. Dighiero G, Binet JL. When and how to treat chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2000;343:1799-801.
3. Hallek M, Cheson BD, Catovsky D, et al. Guidelines for the diagnosis and treatment of chronic lymphocytic leukemia: a report from the International Workshop on Chronic Lymphocytic Leukemia updating the National Cancer Institute-Working Group 1996 guidelines. *Blood* 2008;111:5446-56.
4. O'Brien S, del GA, Keating M. Advances in the biology and treatment of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1995;85:307-18.
5. Zengin N, Kars A, Sungur A, et al. The significance of the bone marrow biopsy pattern in chronic lymphocytic leukemia: a prognostic dilemma. *Am J Hematol* 1999;62:208-11.
6. Gribben JG, O'Brien S. Update on therapy of chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2011;29:544-50.
7. Hallek M, Pflug N. State of the art treatment of chronic lymphocytic leukaemia. *Blood Rev* 2011;25:1-9.
8. Zenz T, Mertens D, Kuppers R, Dohner H, Stilgenbauer S. From pathogenesis to treatment of chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Cancer* 2010;10:37-50.
9. Finch SC, Linet MS. Chronic leukaemias. *Baillieres Clin Haematol* 1992;5:27-56.
10. Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin* 2008;58:71-96.
11. Chang YH, Park J, Kim HC, et al. Korean patients with chronic lymphocytic leukemia show the similar types of chromosomal aberrations as those in Europe and North America. *Leuk Res* 2006;30:695-9.
12. Dores GM, Anderson WF, Curtis RE, et al. Chronic lymphocytic leukaemia and small lymphocytic lymphoma: overview of the descriptive epidemiology. *Br J Haematol* 2007;139:809-19.
13. Hallek M. Chronic lymphocytic leukemia: 2015 Update on diagnosis, risk stratification, and treatment. *Am J Hematol* 2015;90:446-60.
14. Watson L, Wyld P, Catovsky D. Disease burden of chronic lymphocytic leukaemia within the European Union. *Eur J Haematol* 2008;81:253-8.

15. Dighiero G, Hamblin TJ. Chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet* 2008;371:1017-29.
16. Kikushige Y, Ishikawa F, Miyamoto T, et al. Self-renewing hematopoietic stem cell is the primary target in pathogenesis of human chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Cell* 2011;20:246-59.
17. Ghia P, ten BE, Sanz E, de la Hera A, Rolink A, Melchers F. Ordering of human bone marrow B lymphocyte precursors by single-cell polymerase chain reaction analyses of the rearrangement status of the immunoglobulin H and L chain gene loci. *J Exp Med* 1996;184:2217-29.
18. Jung D, Giallourakis C, Mostoslavsky R, Alt FW. Mechanism and control of V(D)J recombination at the immunoglobulin heavy chain locus. *Annu Rev Immunol* 2006;24:541-70.
19. Klein U, Dalla-Favera R. Germinal centres: role in B-cell physiology and malignancy. *Nat Rev Immunol* 2008;8:22-33.
20. Leavy O. V(D)J recombination: RAG recombination centres. *Nat Rev Immunol* 2010;10:383.
21. LeBien TW, Tedder TF. B lymphocytes: how they develop and function. *Blood* 2008;112:1570-80.
22. Weill JC, Weller S, Reynaud CA. Human marginal zone B cells. *Annu Rev Immunol* 2009;27:267-85.
23. Carsetti R, Rosado MM, Wardmann H. Peripheral development of B cells in mouse and man. *Immunol Rev* 2004;197:179-91.
24. Messmer BT, Messmer D, Allen SL, et al. In vivo measurements document the dynamic cellular kinetics of chronic lymphocytic leukemia B cells. *J Clin Invest* 2005;115:755-64.
25. Martin F, Kearney JF. Marginal-zone B cells. *Nat Rev Immunol* 2002;2:323-35.
26. Klein U, Tu Y, Stolovitzky GA, et al. Gene expression profiling of B cell chronic lymphocytic leukemia reveals a homogeneous phenotype related to memory B cells. *J Exp Med* 2001;194:1625-38.
27. Rosenwald A, Alizadeh AA, Widhopf G, et al. Relation of gene expression phenotype to immunoglobulin mutation genotype in B cell chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med* 2001;194:1639-47.
28. Marie-Cardine A, Divay F, Dutot I, et al. Transitional B cells in humans: characterization and insight from B lymphocyte reconstitution after hematopoietic stem cell transplantation. *Clin Immunol* 2008;127:14-25.

29. Fabbri G, Dalla-Favera R. The molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Cancer* 2016;16:145-62.
30. Seifert M, Sellmann L, Bloehdorn J, et al. Cellular origin and pathophysiology of chronic lymphocytic leukemia. *J Exp Med* 2012;209:2183-98.
31. Zhang S, Kipps TJ. The pathogenesis of chronic lymphocytic leukemia. *Annu Rev Pathol* 2014;9:103-18.
32. Cramer P, Hallek M. Prognostic factors in chronic lymphocytic leukemia-what do we need to know? *Nat Rev Clin Oncol* 2011;8:38-47.
33. Rai KR, Sawitsky A, Cronkite EP, Chanana AD, Levy RN, Pasternack BS. Clinical staging of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1975;46:219-34.
34. Binet JL. [New data on the prognosis of chronic lymphoid leukemia ; anatomo-clinical classification]. *Acquis Med Recent* 1981;198:191-200.
35. Gonzalez Rodriguez AP, Gonzalez GE, Fernandez AC, Gonzalez Huerta AJ, Gonzalez RS. [B-chronic lymphocytic leukemia: epidemiological study and comparison of MDACC and GIMENA pronostic indexes]. *Med Clin (Barc)* 2009;133:161-6.
36. Van BF, Verhasselt B, Philippe J. Prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia: a comprehensive review. *Blood Rev* 2009;23:25-47.
37. Vroblova V, Smolej L, Vrbacky F, et al. Biological prognostic markers in chronic lymphocytic leukemia. *Acta Medica (Hradec Kralove)* 2009;52:3-8.
38. Geisler CH, Hou-Jensen K, Jensen OM, et al. The bone-marrow infiltration pattern in B-cell chronic lymphocytic leukemia is not an important prognostic factor. Danish CLL Study Group. *Eur J Haematol* 1996;57:292-300.
39. Schade U, Bock O, Vornhusen S, et al. Bone marrow infiltration pattern in B-cell chronic lymphocytic leukemia is related to immunoglobulin heavy-chain variable region mutation status and expression of 70-kd zeta-associated protein (ZAP-70). *Hum Pathol* 2006;37:1153-61.
40. Vallespi T, Montserrat E, Sanz MA. Chronic lymphocytic leukaemia: prognostic value of lymphocyte morphological subtypes. A multivariate survival analysis in 146 patients. *Br J Haematol* 1991;77:478-85.
41. Hallek M, Wanders L, Ostwald M, et al. Serum beta(2)-microglobulin and serum thymidine kinase are independent predictors of progression-free survival in chronic lymphocytic leukemia and immunocytoma. *Leuk Lymphoma* 1996;22:439-47.

42. Wierda WG, O'Brien S, Wang X, et al. Characteristics associated with important clinical end points in patients with chronic lymphocytic leukemia at initial treatment. *J Clin Oncol* 2009;27:1637-43.
43. Magnac C, Porcher R, Davi F, et al. Predictive value of serum thymidine kinase level for Ig-V mutational status in B-CLL. *Leukemia* 2003;17:133-7.
44. Konoplev SN, Fritsche HA, O'Brien S, et al. High serum thymidine kinase 1 level predicts poorer survival in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Am J Clin Pathol* 2010;134:472-7.
45. Chen L, Widhopf G, Huynh L, et al. Expression of ZAP-70 is associated with increased B-cell receptor signaling in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002;100:4609-14.
46. Wiestner A, Rosenwald A, Barry TS, et al. ZAP-70 expression identifies a chronic lymphocytic leukemia subtype with unmutated immunoglobulin genes, inferior clinical outcome, and distinct gene expression profile. *Blood* 2003;101:4944-51.
47. Calpe E, Purroy N, Carpio C, et al. ZAP-70 promotes the infiltration of malignant B-lymphocytes into the bone marrow by enhancing signaling and migration after CXCR4 stimulation. *PLoS One* 2013;8:e81221.
48. Gobessi S, Laurenti L, Longo PG, Sica S, Leone G, Efremov DG. ZAP-70 enhances B-cell-receptor signaling despite absent or inefficient tyrosine kinase activation in chronic lymphocytic leukemia and lymphoma B cells. *Blood* 2007;109:2032-9.
49. Crespo M, Bosch F, Villamor N, et al. ZAP-70 expression as a surrogate for immunoglobulin-variable-region mutations in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2003;348:1764-75.
50. Hayat A, O'Brien D, O'Rourke P, et al. CD38 expression level and pattern of expression remains a reliable and robust marker of progressive disease in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2006;47:2371-9.
51. Orchard JA, Ibbotson RE, Davis Z, et al. ZAP-70 expression and prognosis in chronic lymphocytic leukaemia. *Lancet* 2004;363:105-11.
52. Rassenti LZ, Huynh L, Toy TL, et al. ZAP-70 compared with immunoglobulin heavy-chain gene mutation status as a predictor of disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2004;351:893-901.
53. Patten PE, Buggins AG, Richards J, et al. CD38 expression in chronic lymphocytic leukemia is regulated by the tumor microenvironment. *Blood* 2008;111:5173-81.
54. Deaglio S, Vaisitti T, Aydin S, Ferrero E, Malavasi F. In-tandem insight from basic science combined with clinical research: CD38 as both marker and key component of the pathogenetic network underlying chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2006;108:1135-44.

55. Malavasi F, Deaglio S, Funaro A, et al. Evolution and function of the ADP ribosyl cyclase/CD38 gene family in physiology and pathology. *Physiol Rev* 2008;88:841-86.
56. Heintel D, Schwarzingler I, Chizzali-Bonfadin C, et al. Association of CD38 antigen expression with other prognostic parameters in early stages of chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2001;42:1315-21.
57. Rassenti LZ, Jain S, Keating MJ, et al. Relative value of ZAP-70, CD38, and immunoglobulin mutation status in predicting aggressive disease in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2008;112:1923-30.
58. Schroers R, Griesinger F, Trumper L, et al. Combined analysis of ZAP-70 and CD38 expression as a predictor of disease progression in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2005;19:750-8.
59. Oscier DG, Gardiner AC, Mould SJ, et al. Multivariate analysis of prognostic factors in CLL: clinical stage, IGVH gene mutational status, and loss or mutation of the p53 gene are independent prognostic factors. *Blood* 2002;100:1177-84.
60. Chevallier P, Penther D, Avet-Loiseau H, et al. CD38 expression and secondary 17p deletion are important prognostic factors in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2002;116:142-50.
61. Krober A, Seiler T, Benner A, et al. V(H) mutation status, CD38 expression level, genomic aberrations, and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2002;100:1410-6.
62. Kharfan-Dabaja MA, Chavez JC, Khorfan KA, Pinilla-Ibarz J. Clinical and therapeutic implications of the mutational status of IgVH in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 2008;113:897-906.
63. Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999;94:1848-54.
64. Zenz T, Krober A, Scherer K, et al. Monoallelic TP53 inactivation is associated with poor prognosis in chronic lymphocytic leukemia: results from a detailed genetic characterization with long-term follow-up. *Blood* 2008;112:3322-9.
65. Hamblin TJ, Davis Z, Gardiner A, Oscier DG, Stevenson FK. Unmutated Ig V(H) genes are associated with a more aggressive form of chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999;94:1848-54.
66. Damle RN, Wasil T, Fais F, et al. Ig V gene mutation status and CD38 expression as novel prognostic indicators in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 1999;94:1840-7.

67. Foa R, Del G, I, Guarini A, Rossi D, Gaidano G. Clinical implications of the molecular genetics of chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 2013;98:675-85.
68. Zenz T, Mertens D, Dohner H, Stilgenbauer S. Importance of genetics in chronic lymphocytic leukemia. *Blood Rev* 2011;25:131-7.
69. Dohner H, Stilgenbauer S, Benner A, et al. Genomic aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2000;343:1910-6.
70. Gunnarsson R, Mansouri L, Isaksson A, et al. Array-based genomic screening at diagnosis and during follow-up in chronic lymphocytic leukemia. *Haematologica* 2011;96:1161-9.
71. Juliusson G, Robert KH, Ost A, et al. Prognostic information from cytogenetic analysis in chronic B-lymphocytic leukemia and leukemic immunocytoma. *Blood* 1985;65:134-41.
72. Rossi D, Rasi S, Spina V, et al. Integrated mutational and cytogenetic analysis identifies new prognostic subgroups in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2013;121:1403-12.
73. Gunnarsson R, Mansouri L, Rosenquist R. Exploring the genetic landscape in chronic lymphocytic leukemia using high-resolution technologies. *Leuk Lymphoma* 2013;54:1583-90.
74. Pospisilova S, Gonzalez D, Malcikova J, et al. ERIC recommendations on TP53 mutation analysis in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2012;26:1458-61.
75. Kujawski L, Ouillet P, Erba H, et al. Genomic complexity identifies patients with aggressive chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2008;112:1993-2003.
76. Mansouri L, Cahill N, Gunnarsson R, et al. NOTCH1 and SF3B1 mutations can be added to the hierarchical prognostic classification in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2013;27:512-4.
77. Grubor V, Krasnitz A, Troge JE, et al. Novel genomic alterations and clonal evolution in chronic lymphocytic leukemia revealed by representational oligonucleotide microarray analysis (ROMA). *Blood* 2009;113:1294-303.
78. Peterson LC, Lindquist LL, Church S, Kay NE. Frequent clonal abnormalities of chromosome band 13q14 in B-cell chronic lymphocytic leukemia: multiple clones, subclones, and nonclonal alterations in 82 midwestern patients. *Genes Chromosomes Cancer* 1992;4:273-80.
79. Puiggros A, Blanco G, Espinet B. Genetic abnormalities in chronic lymphocytic leukemia: where we are and where we go. *Biomed Res Int* 2014;2014:435983.

80. Ouillet P, Erba H, Kujawski L, Kaminski M, Shedden K, Malek SN. Integrated genomic profiling of chronic lymphocytic leukemia identifies subtypes of deletion 13q14. *Cancer Res* 2008;68:1012-21.
81. Calin GA, Dumitru CD, Shimizu M, et al. Frequent deletions and down-regulation of micro- RNA genes miR15 and miR16 at 13q14 in chronic lymphocytic leukemia. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:15524-9.
82. Klein U, Lia M, Crespo M, et al. The DLEU2/miR-15a/16-1 cluster controls B cell proliferation and its deletion leads to chronic lymphocytic leukemia. *Cancer Cell* 2010;17:28-40.
83. Cimmino A, Calin GA, Fabbri M, et al. miR-15 and miR-16 induce apoptosis by targeting BCL2. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102:13944-9.
84. Reddy KS. Chronic lymphocytic leukaemia profiled for prognosis using a fluorescence in situ hybridisation panel. *Br J Haematol* 2006;132:705-22.
85. Chena C, Avalos JS, Bezares RF, et al. Biallelic deletion 13q14.3 in patients with chronic lymphocytic leukemia: cytogenetic, FISH and clinical studies. *Eur J Haematol* 2008;81:94-9.
86. Van Dyke DL, Shanafelt TD, Call TG, et al. A comprehensive evaluation of the prognostic significance of 13q deletions in patients with B-chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2010;148:544-50.
87. Garg R, Wierda W, Ferrajoli A, et al. The prognostic difference of monoallelic versus biallelic deletion of 13q in chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 2012;118:3531-7.
88. Puiggros A, Delgado J, Rodriguez-Vicente A, et al. Biallelic losses of 13q do not confer a poorer outcome in chronic lymphocytic leukaemia: analysis of 627 patients with isolated 13q deletion. *Br J Haematol* 2013;163:47-54.
89. Hernando E, Nahle Z, Juan G, et al. Rb inactivation promotes genomic instability by uncoupling cell cycle progression from mitotic control. *Nature* 2004;430:797-802.
90. Mian M, Rinaldi A, Mensah AA, et al. Del(13q14.3) length matters: an integrated analysis of genomic, fluorescence in situ hybridization and clinical data in 169 chronic lymphocytic leukaemia patients with 13q deletion alone or a normal karyotype. *Hematol Oncol* 2012;30:46-9.
91. Parker H, Rose-Zerilli MJ, Parker A, et al. 13q deletion anatomy and disease progression in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2011;25:489-97.

92. Dal BM, Rossi FM, Rossi D, et al. 13q14 deletion size and number of deleted cells both influence prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Genes Chromosomes Cancer* 2011;50:633-43.
93. Orlandi EM, Bernasconi P, Pascutto C, et al. Chronic lymphocytic leukemia with del13q14 as the sole abnormality: dynamic prognostic estimate by interphase-FISH. *Hematol Oncol* 2013;31:136-42.
94. Garcia-Marco JA, Price CM, Ellis J, et al. Correlation of trisomy 12 with proliferating cells by combined immunocytochemistry and fluorescence in situ hybridization in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 1996;10:1705-11.
95. Garcia-Marco J, Matutes E, Morilla R, et al. Trisomy 12 in B-cell chronic lymphocytic leukaemia: assessment of lineage restriction by simultaneous analysis of immunophenotype and genotype in interphase cells by fluorescence in situ hybridization. *Br J Haematol* 1994;87:44-50.
96. Jeromin S, Weissmann S, Haferlach C, et al. SF3B1 mutations correlated to cytogenetics and mutations in NOTCH1, FBXW7, MYD88, XPO1 and TP53 in 1160 untreated CLL patients. *Leukemia* 2014;28:108-17.
97. Landau DA, Carter SL, Stojanov P, et al. Evolution and impact of subclonal mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Cell* 2013;152:714-26.
98. Hallek M, Fischer K, Fingerle-Rowson G, et al. Addition of rituximab to fludarabine and cyclophosphamide in patients with chronic lymphocytic leukaemia: a randomised, open-label, phase 3 trial. *Lancet* 2010;376:1164-74.
99. Tam CS, Otero-Palacios J, Abruzzo LV, et al. Chronic lymphocytic leukaemia CD20 expression is dependent on the genetic subtype: a study of quantitative flow cytometry and fluorescent in-situ hybridization in 510 patients. *Br J Haematol* 2008;141:36-40.
100. Zenz T, Vollmer D, Trbusek M, et al. TP53 mutation profile in chronic lymphocytic leukemia: evidence for a disease specific profile from a comprehensive analysis of 268 mutations. *Leukemia* 2010;24:2072-9.
101. Dierlamm J, Wlodarska I, Michaux L, et al. FISH identifies different types of duplications with 12q13-15 as the commonly involved segment in B-cell lymphoproliferative malignancies characterized by partial trisomy 12. *Genes Chromosomes Cancer* 1997;20:155-66.
102. Sellmann L, Gesk S, Walter C, et al. Trisomy 19 is associated with trisomy 12 and mutated IGHV genes in B-chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2007;138:217-20.
103. Balatti V, Bottoni A, Palamarchuk A, et al. NOTCH1 mutations in CLL associated with trisomy 12. *Blood* 2012;119:329-31.

104. Lopez C, Delgado J, Costa D, et al. Different distribution of NOTCH1 mutations in chronic lymphocytic leukemia with isolated trisomy 12 or associated with other chromosomal alterations. *Genes Chromosomes Cancer* 2012;51:881-9.
105. Riches JC, O'Donovan CJ, Kingdon SJ, et al. Trisomy 12 chronic lymphocytic leukemia cells exhibit upregulation of integrin signaling that is modulated by NOTCH1 mutations. *Blood* 2014;123:4101-10.
106. Zucchetto A, Caldana C, Benedetti D, et al. CD49d is overexpressed by trisomy 12 chronic lymphocytic leukemia cells: evidence for a methylation-dependent regulation mechanism. *Blood* 2013;122:3317-21.
107. Greipp PT, Smoley SA, Viswanatha DS, et al. Patients with chronic lymphocytic leukaemia and clonal deletion of both 17p13.1 and 11q22.3 have a very poor prognosis. *Br J Haematol* 2013;163:326-33.
108. Stilgenbauer S, Zenz T, Winkler D, et al. Subcutaneous alemtuzumab in fludarabine-refractory chronic lymphocytic leukemia: clinical results and prognostic marker analyses from the CLL2H study of the German Chronic Lymphocytic Leukemia Study Group. *J Clin Oncol* 2009;27:3994-4001.
109. Zenz T, Habe S, Denzel T, et al. Detailed analysis of p53 pathway defects in fludarabine-refractory chronic lymphocytic leukemia (CLL): dissecting the contribution of 17p deletion, TP53 mutation, p53-p21 dysfunction, and miR34a in a prospective clinical trial. *Blood* 2009;114:2589-97.
110. Ouillet P, Fossum S, Parkin B, et al. Aggressive chronic lymphocytic leukemia with elevated genomic complexity is associated with multiple gene defects in the response to DNA double-strand breaks. *Clin Cancer Res* 2010;16:835-47.
111. Ouillet P, Collins R, Shakhan S, et al. Acquired genomic copy number aberrations and survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2011;118:3051-61.
112. Britt-Compton B, Lin TT, Ahmed G, et al. Extreme telomere erosion in ATM-mutated and 11q-deleted CLL patients is independent of disease stage. *Leukemia* 2012;26:826-30.
113. Marasca R, Maffei R, Martinelli S, et al. Clinical heterogeneity of de novo 11q deletion chronic lymphocytic leukaemia: prognostic relevance of extent of 11q deleted nuclei inside leukemic clone. *Hematol Oncol* 2013;31:88-95.
114. Wierda WG, O'Brien S, Wang X, et al. Multivariable model for time to first treatment in patients with chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2011;29:4088-95.
115. Goede V, Fischer K, Busch R, et al. Obinutuzumab plus chlorambucil in patients with CLL and coexisting conditions. *N Engl J Med* 2014;370:1101-10.

116. Gardiner A, Parker H, Glide S, et al. A new minimal deleted region at 11q22.3 reveals the importance of interpretation of diminished FISH signals and the choice of probe for ATM deletion screening in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res* 2012;36:307-10.
117. Khanna KK, Jackson SP. DNA double-strand breaks: signaling, repair and the cancer connection. *Nat Genet* 2001;27:247-54.
118. Sperka T, Wang J, Rudolph KL. DNA damage checkpoints in stem cells, ageing and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2012;13:579-90.
119. Barlow C, Brown KD, Deng CX, Tagle DA, Wynshaw-Boris A. Atm selectively regulates distinct p53-dependent cell-cycle checkpoint and apoptotic pathways. *Nat Genet* 1997;17:453-6.
120. Matsuoka S, Rotman G, Ogawa A, Shiloh Y, Tamai K, Elledge SJ. Ataxia telangiectasia-mutated phosphorylates Chk2 in vivo and in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97:10389-94.
121. Austen B, Powell JE, Alvi A, et al. Mutations in the ATM gene lead to impaired overall and treatment-free survival that is independent of IGVH mutation status in patients with B-CLL. *Blood* 2005;106:3175-82.
122. Skowronska A, Parker A, Ahmed G, et al. Biallelic ATM inactivation significantly reduces survival in patients treated on the United Kingdom Leukemia Research Fund Chronic Lymphocytic Leukemia 4 trial. *J Clin Oncol* 2012;30:4524-32.
123. Austen B, Skowronska A, Baker C, et al. Mutation status of the residual ATM allele is an important determinant of the cellular response to chemotherapy and survival in patients with chronic lymphocytic leukemia containing an 11q deletion. *J Clin Oncol* 2007;25:5448-57.
124. Cuneo A, Bigoni R, Rigolin GM, et al. Late appearance of the 11q22.3-23.1 deletion involving the ATM locus in B-cell chronic lymphocytic leukemia and related disorders. Clinico-biological significance. *Haematologica* 2002;87:44-51.
125. Edelmann J, Holzmann K, Miller F, et al. High-resolution genomic profiling of chronic lymphocytic leukemia reveals new recurrent genomic alterations. *Blood* 2012;120:4783-94.
126. Pfeifer D, Pantic M, Skatulla I, et al. Genome-wide analysis of DNA copy number changes and LOH in CLL using high-density SNP arrays. *Blood* 2007;109:1202-10.
127. Rose-Zerilli MJ, Forster J, Parker H, et al. ATM mutation rather than BIRC3 deletion and/or mutation predicts reduced survival in 11q-deleted chronic lymphocytic leukemia: data from the UK LRF CLL4 trial. *Haematologica* 2014;99:736-42.

128. Malek SN. The biology and clinical significance of acquired genomic copy number aberrations and recurrent gene mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Oncogene* 2013;32:2805-17.
129. Stankovic T, Skowronska A. The role of ATM mutations and 11q deletions in disease progression in chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2014;55:1227-39.
130. Vousden KH, Lane DP. p53 in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8:275-83.
131. Kruse JP, Gu W. Modes of p53 regulation. *Cell* 2009;137:609-22.
132. Pietsch EC, Sykes SM, McMahon SB, Murphy ME. The p53 family and programmed cell death. *Oncogene* 2008;27:6507-21.
133. Vousden KH, Prives C. P53 and prognosis: new insights and further complexity. *Cell* 2005;120:7-10.
134. Vousden KH. Outcomes of p53 activation--spoilt for choice. *J Cell Sci* 2006;119:5015-20.
135. Chipuk JE, Green DR. Cytoplasmic p53: bax and forward. *Cell Cycle* 2004;3:429-31.
136. Moll UM, Wolff S, Speidel D, Deppert W. Transcription-independent pro-apoptotic functions of p53. *Curr Opin Cell Biol* 2005;17:631-6.
137. Chipuk JE, Maurer U, Green DR, Schuler M. Pharmacologic activation of p53 elicits Bax-dependent apoptosis in the absence of transcription. *Cancer Cell* 2003;4:371-81.
138. Leu JI, Dumont P, Hafey M, Murphy ME, George DL. Mitochondrial p53 activates Bak and causes disruption of a Bak-Mcl1 complex. *Nat Cell Biol* 2004;6:443-50.
139. Tait SW, Green DR. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2010;11:621-32.
140. Eichhorst BF, Busch R, Hopfinger G, et al. Fludarabine plus cyclophosphamide versus fludarabine alone in first-line therapy of younger patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2006;107:885-91.
141. Zenz T, Vollmer D, Trbusek M, et al. TP53 mutation profile in chronic lymphocytic leukemia: evidence for a disease specific profile from a comprehensive analysis of 268 mutations. *Leukemia* 2010;24:2072-9.
142. Gonzalez D, Martinez P, Wade R, et al. Mutational status of the TP53 gene as a predictor of response and survival in patients with chronic lymphocytic leukemia: results from the LRF CLL4 trial. *J Clin Oncol* 2011;29:2223-9.

143. Rosenwald A, Chuang EY, Davis RE, et al. Fludarabine treatment of patients with chronic lymphocytic leukemia induces a p53-dependent gene expression response. *Blood* 2004;104:1428-34.
144. Thomas A, Pepper C, Hoy T, Bentley P. Bcl-2 and bax expression and chlorambucil-induced apoptosis in the T-cells and leukaemic B-cells of untreated B-cell chronic lymphocytic leukaemia patients. *Leuk Res* 2000;24:813-21.
145. Haferlach C, Dicker F, Schnittger S, Kern W, Haferlach T. Comprehensive genetic characterization of CLL: a study on 506 cases analysed with chromosome banding analysis, interphase FISH, IgV(H) status and immunophenotyping. *Leukemia* 2007;21:2442-51.
146. Xu-Monette ZY, Medeiros LJ, Li Y, et al. Dysfunction of the TP53 tumor suppressor gene in lymphoid malignancies. *Blood* 2012;119:3668-83.
147. Dicker F, Herholz H, Schnittger S, et al. The detection of TP53 mutations in chronic lymphocytic leukemia independently predicts rapid disease progression and is highly correlated with a complex aberrant karyotype. *Leukemia* 2009;23:117-24.
148. Forconi F, Rinaldi A, Kwee I, et al. Genome-wide DNA analysis identifies recurrent imbalances predicting outcome in chronic lymphocytic leukaemia with 17p deletion. *Br J Haematol* 2008;143:532-6.
149. Malcikova J, Smardova J, Rocnova L, Tichy B, Kuglik P, Vranova V, et al. Monoallelic and biallelic inactivation of TP53 gene in chronic lymphocytic leukemia: selection, impact on survival, and response to DNA damage. *Blood*. 2009;114(26):5307-14.
150. Trbusek M, Smardova J, Malcikova J, et al. Missense mutations located in structural p53 DNA-binding motifs are associated with extremely poor survival in chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2011;29:2703-8.
151. Jaglowski SM, Ruppert AS, Heerema NA, et al. Complex karyotype predicts for inferior outcomes following reduced-intensity conditioning allogeneic transplant for chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2012;159:82-7.
152. Delgado J, Salaverria I, Baumann T, et al. Genomic complexity and IGHV mutational status are key predictors of outcome of chronic lymphocytic leukemia patients with TP53 disruption. *Haematologica* 2014;99:e231-e234.
153. Zarnegar BJ, Wang Y, Mahoney DJ, et al. Noncanonical NF-kappaB activation requires coordinated assembly of a regulatory complex of the adaptors cIAP1, cIAP2, TRAF2 and TRAF3 and the kinase NIK. *Nat Immunol* 2008;9:1371-8.
154. Vallabhapurapu S, Karin M. Regulation and function of NF-kappaB transcription factors in the immune system. *Annu Rev Immunol* 2009;27:693-733.

155. Conze DB, Zhao Y, Ashwell JD. Non-canonical NF-kappaB activation and abnormal B cell accumulation in mice expressing ubiquitin protein ligase-inactive c-IAP2. *PLoS Biol* 2010;8:e1000518.
156. Rossi D, Fangazio M, Rasi S, et al. Disruption of BIRC3 associates with fludarabine chemorefractoriness in TP53 wild-type chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2012;119:2854-62.
157. Buggins AG, Pepper C, Patten PE, et al. Interaction with vascular endothelium enhances survival in primary chronic lymphocytic leukemia cells via NF-kappaB activation and de novo gene transcription. *Cancer Res* 2010;70:7523-33.
158. Herishanu Y, Perez-Galan P, Liu D, et al. The lymph node microenvironment promotes B-cell receptor signaling, NF-kappaB activation, and tumor proliferation in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2011;117:563-74.
159. Rossi D, Fangazio M, Gaidano G. The spectrum of genetic defects in chronic lymphocytic leukemia. *Mediterr J Hematol Infect Dis* 2012;4:e2012076.
160. Rossi D, Rasi S, Fabbri G, et al. Mutations of NOTCH1 are an independent predictor of survival in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2012;119:521-9.
161. Will CL, Luhrmann R. Spliceosome structure and function. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2011;3.
162. David CJ, Manley JL. Alternative pre-mRNA splicing regulation in cancer: pathways and programs unhinged. *Genes Dev* 2010;24:2343-64.
163. Wahl MC, Will CL, Luhrmann R. The spliceosome: design principles of a dynamic RNP machine. *Cell* 2009;136:701-18.
164. Wang L, Lawrence MS, Wan Y, et al. SF3B1 and other novel cancer genes in chronic lymphocytic leukemia. *N Engl J Med* 2011;365:2497-506.
165. Quesada V, Conde L, Villamor N, et al. Exome sequencing identifies recurrent mutations of the splicing factor SF3B1 gene in chronic lymphocytic leukemia. *Nat Genet* 2012;44:47-52.
166. Rossi D, Bruscaggin A, Spina V, et al. Mutations of the SF3B1 splicing factor in chronic lymphocytic leukemia: association with progression and fludarabine-refractoriness. *Blood* 2011;118:6904-8.
167. Strefford JC, Sutton LA, Baliakas P, et al. Distinct patterns of novel gene mutations in poor-prognostic stereotyped subsets of chronic lymphocytic leukemia: the case of SF3B1 and subset #2. *Leukemia* 2013;27:2196-9.
168. Das BK, Xia L, Palandjian L, Gozani O, Chyung Y, Reed R. Characterization of a protein complex containing spliceosomal proteins SAPs 49, 130, 145, and 155. *Mol Cell Biol* 1999;19:6796-802.

169. Arora PS, Ansari AZ. Chemical biology: A Notch above other inhibitors. *Nature* 2009;462:171-3.
170. Nam Y, Sliz P, Song L, Aster JC, Blacklow SC. Structural basis for cooperativity in recruitment of MAML coactivators to Notch transcription complexes. *Cell* 2006;124:973-83.
171. Heitzler P. Biodiversity and noncanonical Notch signaling. *Curr Top Dev Biol* 2010;92:457-81.
172. Williams SE, Beronja S, Pasolli HA, Fuchs E. Asymmetric cell divisions promote Notch-dependent epidermal differentiation. *Nature* 2011;470:353-8.
173. Paganin M, Ferrando A. Molecular pathogenesis and targeted therapies for NOTCH1-induced T-cell acute lymphoblastic leukemia. *Blood Rev* 2011;25:83-90.
174. Rothenberg EV. T cell lineage commitment: identity and renunciation. *J Immunol* 2011;186:6649-55.
175. Santos MA, Sarmento LM, Rebelo M, et al. Notch1 engagement by Delta-like-1 promotes differentiation of B lymphocytes to antibody-secreting cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2007;104:15454-9.
176. Aster JC, Blacklow SC, Pear WS. Notch signalling in T-cell lymphoblastic leukaemia/lymphoma and other haematological malignancies. *J Pathol* 2011;223:262-73.
177. Lobry C, Oh P, Aifantis I. Oncogenic and tumor suppressor functions of Notch in cancer: it's NOTCH what you think. *J Exp Med* 2011;208:1931-5.
178. Fabbri G, Rasi S, Rossi D, et al. Analysis of the chronic lymphocytic leukemia coding genome: role of NOTCH1 mutational activation. *J Exp Med* 2011;208:1389-401.
179. Puente XS, Pinyol M, Quesada V, et al. Whole-genome sequencing identifies recurrent mutations in chronic lymphocytic leukaemia. *Nature* 2011;475:101-5.
180. Del G, I, Rossi D, Chiaretti S, et al. NOTCH1 mutations in +12 chronic lymphocytic leukemia (CLL) confer an unfavorable prognosis, induce a distinctive transcriptional profiling and refine the intermediate prognosis of +12 CLL. *Haematologica* 2012;97:437-41.
181. Sportoletti P, Baldoni S, Cavalli L, Del Papa B, Bonifacio E, Ciurnelli R, et al. NOTCH1 PEST domain mutation is an adverse prognostic factor in B-CLL. *Br J Haematol* 2010;151:404-6.
182. Villamor N, Conde L, Martínez-Trillos A, Cazorla M, Navarro A, Beà S, et al. NOTCH1 mutations identify a genetic subgroup of chronic lymphocytic leukemia

- patients with high risk of transformation and poor outcome. *Leukemia* 2013;27:1100–6.
183. Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer* 1994;73:2013–26.
184. Hacker G. The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res* 2000;301:5–17.
185. Fadok VA, Voelker DR, Campbell PA, Cohen JJ, Bratton DL, Henson PM. Exposure of phosphatidylserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophages. *J Immunol* 1992;148:2207–16.
186. Kroemer G. Mitochondrial control of apoptosis: an introduction. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;304:433–5.
187. Choi C, Benveniste EN. Fas ligand/Fas system in the brain: regulator of immune and apoptotic responses. *Brain Res Brain Res Rev* 2004;44:65–81.
188. Ashkenazi A, Dixit VM. Death receptors: signaling and modulation. *Science* 1998;281:1305–8.
189. Acehan D, Jiang X, Morgan DG, et al. Three-dimensional structure of the apoptosome: implications for assembly, procaspase-9 binding, and activation. *Mol Cell* 2002;9:423–32.
190. Pepper C, Hoy T, Bentley DP. Bcl-2/Bax ratios in chronic lymphocytic leukaemia and their correlation with in vitro apoptosis and clinical resistance. *Br J Cancer* 1997;76:935–8.
191. Pepper C, Hoy T, Bentley P, Elevated. Bcl-2/Bax are a consistent feature of apoptosis resistance in B-cell chronic lymphocytic leukaemia and are correlated with in vivo chemoresistance. *Leuk Lymphoma* 1998;28:355–61.
192. Kitada S, Andersen J, Akar S, et al. Expression of apoptosis-regulating proteins in chronic lymphocytic leukemia: correlations with in vitro and in vivo chemoresponses. *Blood* 1998;91:3379–89.
193. Faderl S, Keating MJ, Do KA, et al. Expression profile of 11 proteins and their prognostic significance in patients with chronic lymphocytic leukemia (CLL). *Leukemia* 2002;16:1045–52.
194. Robertson LE, Plunkett W, McConnell K, Keating MJ, McDonnell TJ. Bcl-2 expression in chronic lymphocytic leukemia and its correlation with the induction of apoptosis and clinical outcome. *Leukemia* 1996;10:456–9.
195. McConkey DJ, Chandra J, Wright S, et al. Apoptosis sensitivity in chronic lymphocytic leukemia is determined by endogenous endonuclease content and relative expression of BCL-2 and BAX. *J Immunol* 1996;156: 2624–30.

196. Thomas A, El Rouby S, Reed JC, et al. Drug-induced apoptosis in B-cell chronic lymphocytic leukemia: relationship between p53 gene mutation and bcl-2/bax proteins in drug resistance. *Oncogene* 1996;12:1055–62
197. Pepper C, Thomas A, Hoy T, Bentley P. Chlorambucil resistance in B-cell chronic lymphocytic leukaemia is mediated through failed Bax induction and selection of high Bcl-2-expressing subclones. *Br J Haematol* 1999;104:581–8.
198. Adams JM, Cory S. The Bcl-2 protein family: arbiters of cell survival. *Science* 1998;281:1322–6.
199. Buggins AG, Pepper CJ. The role of Bcl-2 family proteins in chronic lymphocytic leukaemia. *Leuk Res* 2010;34:837–42.
200. Czabotar PE, Lessene G, Strasser A, Adams JM. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2014;15:49–63.
201. Willis SN, Fletcher JI, Kaufmann T, et al. Apoptosis initiated when BH3 ligands engage multiple Bcl-2 homologs, not Bax or Bak. *Science* 2007;315:856–9.
202. Letai A, Bassik MC, Walensky LD, et al. Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell* 2002;2:183–92.
203. Llambi, F. et al. A Unified model of mammalian BCL-2 protein family interactions at the mitochondria. *Mol. Cell* 44, 517–531 (2011)
204. Letai A, Bassik MC, Walensky LD, Sorcinelli MD, Weiler S, Korsmeyer SJ. Distinct BH3 domains either sensitize or activate mitochondrial apoptosis, serving as prototype cancer therapeutics. *Cancer Cell* 2002;2:183–92.
205. Chen L, Willis SN, Wei A, et al. Differential targeting of prosurvival Bcl-2 proteins by their BH3-only ligands allows complementary apoptotic function. *Mol Cell* 2005;17:393–403.
206. Sanz L, Garcia-Marco JA, Casanova B, et al. Bcl-2 family gene modulation during spontaneous apoptosis of B-chronic lymphocytic leukemia cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2004;315:562–7.
207. Pepper C, Thomas A, Hidalgo de Quintana J, et al. Pleiotropic drug resistance in B-cell chronic lymphocytic leukaemia— the role of Bcl-2 family dysregulation. *Leuk Res* 1999;23:1007–14.
208. Hussain SR, Cheney CM, Johnson AJ, et al. Mcl-1 is a relevant therapeutic target in acute and chronic lymphoid malignancies: down-regulation enhances rituximab-mediated apoptosis and complement-dependent cytotoxicity. *Clin Cancer Res* 2007;13:2144–50.

209. Pepper C, Lin TT, Pratt G, et al. Mcl-1 expression has in vitro and in vivo significance in chronic lymphocytic leukaemia and is associated with other poor prognostic markers. *Blood* 2008;112:3807–17.
210. Derenne S, Monia B, Dean NM, et al. Antisense strategy shows that Mcl-1 rather than Bcl-2 or Bcl-x(L) is an essential survival protein of human myeloma cells. *Blood* 2002;100:194–9.
211. Michels J, O'Neill JW, Dallman CL, et al. Mcl-1 is required for Akata6 B lymphoma cell survival and is converted to a cell death molecule by efficient caspase-mediated cleavage. *Oncogene* 2004;23:4818–27.
212. Perciavalle RM, Opferman JT. Delving deeper: MCL-1's contributions to normal and cancer biology. *Trends Cell Biol* 2013;23:22–9.
213. Balakrishnan K, Wierda WG, Keating MJ, Gandhi V. Gossypol, a BH3 mimetic, induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 2008;112:1971–80.
214. Ghiotto F, Fais F, Tenca C, et al. Apoptosis of B-cell chronic lymphocytic leukemia cells induced by a novel BH3 peptidomimetic. *Cancer Biol Ther* 2009;8:263–71.
215. Chen R, Keating MJ, Gandhi V, Plunkett W. Transcription inhibition by flavopiridol: mechanism of chronic lymphocytic leukemia cell death. *Blood* 2005;106:2513–9.
216. Thomas LW, Lam C, Edwards SW. Mcl-1; the molecular regulation of protein function. *FEBS Lett* 2010;584:2981–9.
217. Longo PG, Laurenti L, Gobessi S, et al. The Akt/Mcl-1 pathway plays a prominent role in mediating antiapoptotic signals downstream of the B-cell receptor in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood* 2008;111:846–55.
218. Petlickovski A, Laurenti L, Li X, et al. Sustained signaling through the B-cell receptor induces Mcl-1 and promotes survival of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood* 2005;105:4820–7.
219. Chipuk JE, Kuwana T, Bouchier-Hayes L, et al. Direct activation of Bax by p53 mediates mitochondrial membrane permeabilization and apoptosis. *Science* 2004;303:1010–4.
220. Deng X, Gao F, Flagg T, Anderson J, May WS. Bcl2's flexible loop domain regulates p53 binding and survival. *Mol Cell Biol* 2006;26:4421–34.
221. Mackus WJ, Kater AP, Grummels A, et al. Chronic lymphocytic leukemia cells display p53-dependent drug-induced Puma upregulation. *Leukemia* 2005;19:427–34.
222. Ruan J, Hyjek E, Kermani P, et al. Magnitude of stromal hemangiogenesis correlates with histologic subtype of non-Hodgkin's lymphoma. *Clin Cancer Res*. 2006;12(19):5622–31.

223. Burger JA, Kipps TJ. Chemokine receptors and stromal cells in the homing and homeostasis of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Leuk Lymphoma*. 2002;43(3):461-466.
224. Caligaris-Cappio F. Role of the microenvironment in chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 2003;123(3):380-388
225. Stein H, Bonk A, Tolksdorf G, Lennert K, Rodt H, Gerdes J. Immunohistologic analysis of the organization of normal lymphoid tissue and non-Hodgkin's lymphomas. *J Histochem Cytochem*. 1980;28(8):746-60.
226. Burger JA, Ghia P, Rosenwald A, Caligaris-Cappio F. The microenvironment in mature B-cell malignancies: a target for new treatment strategies. *Blood*. 2009;114(16):3367-75.
227. Collins RJ, Verschuer LA, Harmon BV, Prentice RL, Pope JH, Kerr JF. Spontaneous programmed death (apoptosis) of B-chronic lymphocytic leukaemia cells following their culture in vitro. *Br J Haematol*. 1989;71:343-350.
228. Kitada S, Andersen J, Akar S, et al. Expression of apoptosis-regulating proteins in chronic lymphocytic leukemia: correlations with in vitro and in vivo chemoresponses. *Blood*. 1998;91:3379-3389.
229. Burger JA, Tsukada N, Burger M, Zvaifler NJ, Dell'Aquila M, Kipps TJ. Blood-derived nurse-like cells protect chronic lymphocytic leukemia B cells from spontaneous apoptosis through stromal cell-derived factor-1. *Blood*. 2000;96(8):2655-63.
230. Panayiotidis P, Jones D, Ganeshaguru K, Foroni L, Hoffbrand AV. Human bone marrow stromal cells prevent apoptosis and support the survival of chronic lymphocytic leukaemia cells in vitro. *Br J Haematol*. 1996;92(1):97-103.
231. Lagneaux L, Delforge A, Bron D, De Bruyn C, Stryckmans P. Chronic lymphocytic leukemic B cells but not normal B cells are rescued from apoptosis by contact with normal bone marrow stromal cells. *Blood*. 1998;91(7):2387-96.
232. Friedberg JW, Sharman J, Sweetenham J, et al. Inhibition of Syk with fostamatinib disodium has significant clinical activity in non-Hodgkin lymphoma and chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2010;115(13):2578-85.
233. Advani RH, Buggy JJ, Sharman JP, et al. Bruton tyrosine kinase inhibitor ibrutinib (PCI-32765) has significant activity in patients with relapsed/refractory B-cell malignancies. *J Clin Oncol*. 2013;31:88-94.
234. Jurlander J. The cellular biology of B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Crit Rev Oncol Hematol* 1998;27:29-52.
235. Seiffert M, Stilgenbauer S, Dohner H, Lichter P. Efficient nucleofection of primary human B cells and B-CLL cells induces apoptosis, which depends on the

- microenvironment and on the structure of transfected nucleic acids. *Leukemia* 2007;21:1977-83.
236. Badoux X, Bueso-Ramos C, Harris D, et al. Cross-talk between chronic lymphocytic leukemia cells and bone marrow endothelial cells: role of signal transducer and activator of transcription 3. *Hum Pathol* 2011;42:1989-2000.
237. Buggins AG, Pepper C, Patten PE, et al. Interaction with vascular endothelium enhances survival in primary chronic lymphocytic leukemia cells via NF-kappaB activation and de novo gene transcription. *Cancer Res* 2010;70:7523-33.
238. Sugiyama T, Kohara H, Noda M, Nagasawa T. Maintenance of the hematopoietic stem cell pool by CXCL12-CXCR4 chemokine signaling in bone marrow stromal cell niches. *Immunity*. 2006; 25(6):977-988.
239. Kalluri R, Zeisberg M. Fibroblasts in cancer. *Nat Rev Cancer*. 2006;6(5):392-401.
240. Kay NE, Shanafelt TD, Strege AK, Lee YK, Bone ND, Raza A. Bone biopsy derived marrow stromal elements rescue chronic lymphocytic leukemia B-cells from spontaneous and drug induced cell death and facilitates an "angiogenic switch". *Leuk Res* 2007;31:899-906.
241. Plander M, Seegers S, Ugocsai P, et al. Different proliferative and survival capacity of CLL-cells in a newly established in vitro model for pseudofollicles. *Leukemia* 2009;23:2118-28.
242. Cyster JG, Ansel KM, Reif K, et al. Follicular stromal cells and lymphocyte homing to follicles. *Immunol Rev* 2000;176:181-93.
243. Harwood NE, Batista FD. New insights into the early molecular events underlying B cell activation. *Immunity* 2008;28:609-19.
244. Ruan J, Hyjek E, Kermani P, et al. Magnitude of stromal hemangiogenesis correlates with histologic subtype of non-Hodgkin's lymphoma. *Clin Cancer Res* 2006;12:5622-31.
245. Burger JA, Burger M, Kipps TJ. Chronic lymphocytic leukemia B cells express functional CXCR4 chemokine receptors that mediate spontaneous migration beneath bone marrow stromal cells. *Blood*. 1999;94(11):3658-67.
246. Miyake K, Hasunuma Y, Yagita H, Kimoto M. Requirement for VLA-4 and VLA-5 integrins in lymphoma cells binding to and migration beneath stromal cells in culture. *J Cell Biol*. 1992;119(3):653-62
247. Burger M, Hartmann T, Krome M, et al. Small peptide inhibitors of the CXCR4 chemokine receptor (CD184) antagonize the activation, migration, and antiapoptotic responses of CXCL12 in chronic lymphocytic leukemia B cells. *Blood* 2005;106:1824-30.

248. Panayiotidis P, Jones D, Ganeshaguru K, Foroni L, Hoffbrand AV. Human bone marrow stromal cells prevent apoptosis and support the survival of chronic lymphocytic leukaemia cells in vitro. *Br J Haematol* 1996;92:97-103.
249. Kurtova AV, Balakrishnan K, Chen R, et al. Diverse marrow stromal cells protect CLL cells from spontaneous and drug-induced apoptosis: development of a reliable and reproducible system to assess stromal cell adhesion-mediated drug resistance. *Blood* 2009;114:4441-50.
250. Orimo A, Gupta PB, Sgroi DC, et al. Stromal fibroblasts present in invasive human breast carcinomas promote tumor growth and angiogenesis through elevated SDF-1/CXCL12 secretion. *Cell* 2005;121:335-48.
251. Richardson SJ, Matthews C, Catherwood MA, et al. ZAP-70 expression is associated with enhanced ability to respond to migratory and survival signals in B-cell chronic lymphocytic leukemia (B-CLL). *Blood*. 2006;107(9):3584-92.
252. Nishio M, Endo T, Tsukada N, et al. Nurselike cells express BAFF and APRIL, which can promote survival of chronic lymphocytic leukemia cells via a paracrine pathway distinct from that of SDF-1alpha. *Blood*. 2005;106(3):1012-1020.
253. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, et al. Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science* 1999;284:143-7.
254. Burger JA, Zvaifler NJ, Tsukada N, Firestein GS, Kipps TJ. Fibroblast-like synoviocytes support B-cell pseudoemperipoiesis via a stromal cell-derived factor-1- and CD106 (VCAM- 1)-dependent mechanism. *J Clin Invest*. 2001;107(3):305-15.
255. Redondo-Munoz J, Escobar-Diaz E, Samaniego R, Terol MJ, Garcia-Marco JA, Garcia-Pardo A. MMP-9 in B-cell chronic lymphocytic leukemia is up-regulated by alpha4beta1 integrin or CXCR4 engagement via distinct signaling pathways, localizes to podosomes, and is involved in cell invasion and migration. *Blood* 2006;108:3143-51.
256. Amigo-Jimenez I, Bailon E, Aguilera-Montilla N, Terol MJ, Garcia-Marco JA, Garcia-Pardo A. Bone marrow stroma-induced resistance of chronic lymphocytic leukemia cells to arsenic trioxide involves Mcl-1 upregulation and is overcome by inhibiting the PI3Kdelta or PKCbeta signaling pathways. *Oncotarget* 2015;6:44832-48.
257. Redondo-Munoz J, Ugarte-Berzal E, Terol MJ, et al. Matrix metalloproteinase-9 promotes chronic lymphocytic leukemia b cell survival through its hemopexin domain. *Cancer Cell* 2010;17:160-72.
258. Amigo-Jimenez I, Bailon E, Ugarte-Berzal E, Aguilera-Montilla N, Garcia-Marco JA, Garcia-Pardo A. Matrix metalloproteinase-9 is involved in chronic lymphocytic leukemia cell response to fludarabine and arsenic trioxide. *PLoS One* 2014;9:e99993.

259. Burkle A, Niedermeier M, Schmitt-Graff A, Wierda WG, Keating MJ, Burger JA. Overexpression of the CXCR5 chemokine receptor, and its ligand, CXCL13 in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2007;110(9):3316–25.
260. Tsukada N, Burger JA, Zvaifler NJ, Kipps TJ. Distinctive features of “nurselike” cells that differentiate in the context of chronic lymphocytic leukemia. *Blood*. 2002;99(3):1030–7.
261. Burger JA, Tsukada N, Burger M, Zvaifler NJ, Dell’Aquila M, Kipps TJ. Blood-derived nurse-like cells protect chronic lymphocytic leukemia B cells from spontaneous apoptosis through stromal cell-derived factor-1. *Blood*. 2000;96(8):2655–63.
262. Nishio M, Endo T, Tsukada N, et al. Nurselike cells express BAFF and APRIL, which can promote survival of chronic lymphocytic leukemia cells via a paracrine pathway distinct from that of SDF-1alpha. *Blood*. 2005;106(3):1012–20.
263. Burger JA, Quiroga MP, Hartmann E, et al. High-level expression of the T-cell chemokines CCL3 and CCL4 by chronic lymphocytic leukemia B cells in nurselike cell cocultures and after BCR stimulation. *Blood* 2009;113:3050-8.
264. Ghia P, Strola G, Granziero L, et al. Chronic lymphocytic leukemia B cells are endowed with the capacity to attract CD4+, CD40L+ T cells by producing CCL22. *Eur J Immunol* 2002;32:1403-13.
265. Quiroga MP, Balakrishnan K, Kurtova AV, et al. B-cell antigen receptor signaling enhances chronic lymphocytic leukemia cell migration and survival: specific targeting with a novel Syk inhibitor, R406. *Blood*. 2009;114:1029-1037.
266. Stevenson FK, Caligaris-Cappio F. Chronic lymphocytic leukemia: revelations from the B-cell receptor. *Blood*. 2004;103(12):4389-4395.
267. Kitada S, Zapata JM, Andreeff M, Reed JC. Bryostatin and CD40-ligand enhance apoptosis resistance and induce expression of cell survival genes in B-cell chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol*. 1999;106(4):995-1004.
268. Cyster JG, Ansel KM, Reif K, et al. Follicular stromal cells and lymphocyte homing to follicles. *Immunol Rev*. 2000;176:181-193.
269. Shanafelt TD, Kay NE. The clinical and biologic importance of neovascularization and angiogenic signaling pathways in chronic lymphocytic leukemia. *Semin Oncol* 2006;33:174-85.
270. Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000;407:249-57.
271. Piechnik A, Dmoszynska A, Omiotek M, et al. The VEGF receptor, neuropilin-1, represents a promising novel target for chronic lymphocytic leukemia patients. *Int J Cancer* 2013;133:1489-96.

272. Kay NE, Jelinek DF, Peterson L. Angiogenesis in B-chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Res* 2001;25:485-6.
273. Gora-Tybor J, Blonski JZ, Robak T. Circulating proangiogenic cytokines and angiogenesis inhibitor endostatin in untreated patients with chronic lymphocytic leukemia. *Mediators Inflamm* 2003;12:167-71.
274. Bairey O, Boycov O, Kaganovsky E, Zimra Y, Shaklai M, Rabizadeh E. All three receptors for vascular endothelial growth factor (VEGF) are expressed on B-chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells. *Leuk Res* 2004;28:243-8.
275. Vincenti V, Cassano C, Rocchi M, Persico G. Assignment of the vascular endothelial growth factor gene to human chromosome 6p21.3. *Circulation* 1996;93:1493-5.
276. Gora-Tybor J, Szemraj J, Robak T, Jamroziak K. Clinical relevance of vascular endothelial growth factor type A (VEGFA) and VEGF receptor type 2 (VEGFR2) gene polymorphism in chronic lymphocytic leukemia. *Blood Cells Mol Dis* 2015;54:139-43.
277. Jain L, Vargo CA, Danesi R, et al. The role of vascular endothelial growth factor SNPs as predictive and prognostic markers for major solid tumors. *Mol Cancer Ther* 2009;8:2496-508.
278. Breier G, Albrecht U, Sterrer S, Risau W. Expression of vascular endothelial growth factor during embryonic angiogenesis and endothelial cell differentiation. *Development* 1992;114:521-32.
279. Zachary I, Gliki G. Signaling transduction mechanisms mediating biological actions of the vascular endothelial growth factor family. *Cardiovasc Res* 2001;49:568-81.
280. Jain RK. Molecular regulation of vessel maturation. *Nat Med* 2003;9:685-93.
281. Gora-Tybor J, Blonski JZ, Robak T. Circulating vascular endothelial growth factor (VEGF) and its soluble receptors in patients with chronic lymphocytic leukemia. *Eur Cytokine Netw* 2005;16:41-6.
282. Chen H, Treweek AT, West DC, et al. In vitro and in vivo production of vascular endothelial growth factor by chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 2000;96:3181-7.
283. Otrock ZK, Makarem JA, Shamseddine AI. Vascular endothelial growth factor family of ligands and receptors: review. *Blood Cells Mol Dis* 2007;38:258-68.
284. Karkkainen MJ, Petrova TV. Vascular endothelial growth factor receptors in the regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Oncogene* 2000;19:5598-605.

285. Otrrock ZK, Hatoum HA, Musallam KM, Awada AH, Shamseddine AI. Is VEGF a predictive biomarker to anti-angiogenic therapy? *Crit Rev Oncol Hematol* 2011;79:103-11.
286. Kini AR, Kay NE, Peterson LC. Increased bone marrow angiogenesis in B cell chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2000;14:1414-8.
287. Maffei R, Martinelli S, Castelli I, et al. Increased angiogenesis induced by chronic lymphocytic leukemia B cells is mediated by leukemia-derived Ang2 and VEGF. *Leuk Res* 2010;34:312-21.
288. Ferrajoli A, Manshouri T, Estrov Z, et al. High levels of vascular endothelial growth factor receptor-2 correlate with shortened survival in chronic lymphocytic leukemia. *Clin Cancer Res* 2001;7:795-9.
289. Nor JE, Christensen J, Mooney DJ, Polverini PJ. Vascular endothelial growth factor (VEGF)-mediated angiogenesis is associated with enhanced endothelial cell survival and induction of Bcl-2 expression. *Am J Pathol* 1999;154:375-84.
290. Wang L, Coad JE, Fortney JM, Gibson LF. VEGF-induced survival of chronic lymphocytic leukemia is independent of Bcl-2 phosphorylation. *Leukemia* 2005;19:1486-7.
291. Farahani M, Treweeke AT, Toh CH, et al. Autocrine VEGF mediates the antiapoptotic effect of CD154 on CLL cells. *Leukemia* 2005;19:524-30.
292. Bairey O, Boycov O, Kaganovsky E, Zimra Y, Shaklai M, Rabizadeh E. All three receptors for vascular endothelial growth factor (VEGF) are expressed on B-chronic lymphocytic leukemia (CLL) cells. *Leuk Res* 2004;28:243-8.
293. Lee YK, Bone ND, Strege AK, Shanafelt TD, Jelinek DF, Kay NE. VEGF receptor phosphorylation status and apoptosis is modulated by a green tea component, epigallocatechin-3-gallate (EGCG), in B-cell chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2004;104:788-94.
294. Gehrke I, Gandhirajan RK, Poll-Wolbeck SJ, Hallek M, Kreuzer KA. Bone marrow stromal cell-derived vascular endothelial growth factor (VEGF) rather than chronic lymphocytic leukemia (CLL) cell-derived VEGF is essential for the apoptotic resistance of cultured CLL cells. *Mol Med* 2011;17:619-27.
295. Lee YK, Shanafelt TD, Bone ND, Strege AK, Jelinek DF, Kay NE. VEGF receptors on chronic lymphocytic leukemia (CLL) B cells interact with STAT 1 and 3: implication for apoptosis resistance. *Leukemia* 2005;19:513-23.
296. Till KJ, Spiller DG, Harris RJ, Chen H, Zuzel M, Cawley JC. CLL, but not normal, B cells are dependent on autocrine VEGF and alpha4beta1 integrin for chemokine-induced motility on and through endothelium. *Blood* 2005;105:4813-9.

297. Redondo-Munoz J, Ugarte-Berzal E, Garcia-Marco JA, et al. Alpha4beta1 integrin and 190-kDa CD44v constitute a cell surface docking complex for gelatinase B/MMP-9 in chronic leukemic but not in normal B cells. *Blood* 2008;112:169-78.
298. Ugarte-Berzal E, Redondo-Munoz J, Eroles P, et al. VEGF/VEGFR2 interaction down-regulates matrix metalloproteinase-9 via STAT1 activation and inhibits B chronic lymphocytic leukemia cell migration. *Blood* 2010;115:846-9.
299. Ribatti D, Vacca A, De FG, Ria R, Roncali L, Dammacco F. Role of hematopoietic growth factors in angiogenesis. *Acta Haematol* 2001;106:157-61.
300. Dankbar B, Padro T, Leo R, et al. Vascular endothelial growth factor and interleukin-6 in paracrine tumor-stromal cell interactions in multiple myeloma. *Blood* 2000;95:2630-6.
301. Kumar SA, Hu X, Brown M, et al. Lysophosphatidic acid receptor expression in chronic lymphocytic leukemia leads to cell survival mediated through vascular endothelial growth factor expression. *Leuk Lymphoma* 2009;50:2038-48.
302. Hu X, Mendoza FJ, Sun J, Banerji V, Johnston JB, Gibson SB. Lysophosphatidic acid (LPA) induces the expression of VEGF leading to protection against apoptosis in B-cell derived malignancies. *Cell Signal* 2008;20:1198-208.
303. Smolej L, Andrys C, Krejsek J, et al. [Basic fibroblast growth factor (bFGF) and vascular endothelial growth factor (VEGF) are elevated in peripheral blood plasma of patients with chronic lymphocytic leukemia and decrease after intensive fludarabine-based treatment]. *Vnitr Lek* 2007;53:1171-6.
304. Antic D, Mihaljevic B, Cokic V, et al. Patients with early stage chronic lymphocytic leukemia: new risk stratification based on molecular profiling. *Leuk Lymphoma* 2011;52:1394-7.
305. Shanafelt TD, Byrd JC, LaPlant B, et al. Pretreatment angiogenic cytokines predict response to chemoimmunotherapy in patients with chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2009;146:660-4.
306. Dighiero G, Maloum K, Desablens B, et al. Chlorambucil in indolent chronic lymphocytic leukemia. French Cooperative Group on Chronic Lymphocytic Leukemia. *N Engl J Med* 1998;338:1506-14.
307. CLL trialists' collaborative group. Chemotherapeutic options in chronic lymphocytic leukemia. *J Natl Cancer Inst* 1999;91:861-868.
308. Garcia Marco JA, Giraldo CP, Lopez JJ, et al. [National guidelines for the management of patients with chronic lymphocytic leukemia. Sociedad Española de Hematología y Hemoterapia and Grupo Español de Leucemia Linfocítica Crónica]. *Med Clin (Barc)* 2013;141:175-8.

309. Pflug N, Bahlo J, Shanafelt TD, et al. Development of a comprehensive prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2014;124:49-62.
310. Cortese D, Sutton LA, Cahill N, et al. On the way towards a 'CLL prognostic index': focus on TP53, BIRC3, SF3B1, NOTCH1 and MYD88 in a population-based cohort. *Leukemia* 2014;28:710-3.
311. Shanafelt TD, Jenkins G, Call TG, et al. Validation of a new prognostic index for patients with chronic lymphocytic leukemia. *Cancer* 2009;115:363-72.
312. Wierda WG, O'Brien S, Wang X, et al. Prognostic nomogram and index for overall survival in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2007;109:4679-85.
313. Eichhorst BF, Busch R, Stilgenbauer S, et al. First-line therapy with fludarabine compared with chlorambucil does not result in a major benefit for elderly patients with advanced chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2009;114:3382-91.
314. Eichhorst BF, Busch R, Hopfinger G, et al. Fludarabine plus cyclophosphamide versus fludarabine alone in first-line therapy of younger patients with chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2006;107:885-91.
315. Lepage M, Chevret S, Cazin B, et al. Randomized comparison of fludarabine, CAP, and ChOP in 938 previously untreated stage B and C chronic lymphocytic leukemia patients. *Blood* 2001;98:2319-25.
316. Catovsky D, Richards S, Matutes E, et al. Assessment of fludarabine plus cyclophosphamide for patients with chronic lymphocytic leukaemia (the LRF CLL4 Trial): a randomised controlled trial. *Lancet* 2007;370:230-9.
317. Bosch F, Ferrer A, Lopez-Guillermo A, et al. Fludarabine, cyclophosphamide and mitoxantrone in the treatment of resistant or relapsed chronic lymphocytic leukaemia. *Br J Haematol* 2002;119:976-84.
318. Hallek M. State-of-the-art treatment of chronic lymphocytic leukemia. *Hematology Am Soc Hematol Educ Program* 2009;440-9.
319. Fischer K, Cramer P, Busch R, et al. Bendamustine in combination with rituximab for previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia: a multicenter phase II trial of the German Chronic Lymphocytic Leukemia Study Group. *J Clin Oncol* 2012;30:3209-16.
320. Goede V, Fischer K, Busch R, et al. Obinutuzumab plus chlorambucil in patients with CLL and coexisting conditions. *N Engl J Med* 2014;370:1101-10.
321. Knauf WU, Lissichkov T, Aldaoud A, et al. Phase III randomized study of bendamustine compared with chlorambucil in previously untreated patients with chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2009;27:4378-84.

322. Hillmen P, Skotnicki AB, Robak T, et al. Alemtuzumab compared with chlorambucil as first-line therapy for chronic lymphocytic leukemia. *J Clin Oncol* 2007;25:5616-23.
323. Bogusz J, Majchrzak A, Medra A, Cebula-Obrzut B, Robak T, Smolewski P. Mechanisms of action of the anti-VEGF monoclonal antibody bevacizumab on chronic lymphocytic leukemia cells. *Postepy Hig Med Dosw (Online)* 2013;67:107-18.
324. Sharma RA, Steward WP, Daines CA, Knight RD, O'Byrne KJ, Dalglish AG. Toxicity profile of the immunomodulatory thalidomide analogue, lenalidomide: phase I clinical trial of three dosing schedules in patients with solid malignancies. *Eur J Cancer* 2006;42:2318-25.
325. Vogler M, Butterworth M, Majid A, et al. Concurrent up-regulation of BCL-XL and BCL2A1 induces approximately 1000-fold resistance to ABT-737 in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2009;113:4403-13.
326. O'Brien SM, Claxton DF, Crump M, et al. Phase I study of obatoclax mesylate (GX15-070), a small molecule pan-Bcl-2 family antagonist, in patients with advanced chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2009;113:299-305.
327. Vogler M, Dinsdale D, Sun XM, et al. A novel paradigm for rapid ABT-737-induced apoptosis involving outer mitochondrial membrane rupture in primary leukemia and lymphoma cells. *Cell Death Differ* 2008;15:820-30.
328. Woyach JA, Ruppert AS, Heerema NA, et al. Chemoimmunotherapy with fludarabine and rituximab produces extended overall survival and progression-free survival in chronic lymphocytic leukemia: long-term follow-up of CALGB study 9712. *J Clin Oncol* 2011;29:1349-55.
329. Masiello D, Tulpule A. Bendamustine therapy in chronic lymphocytic leukemia. *Expert Opin Pharmacother* 2009;10:1687-98.
330. Lozanski G, Heerema NA, Flinn IW, et al. Alemtuzumab is an effective therapy for chronic lymphocytic leukemia with p53 mutations and deletions. *Blood* 2004;103:3278-81.
331. Osterborg A, Foa R, Bezares RF, et al. Management guidelines for the use of alemtuzumab in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2009;23:1980-8.
332. Robak T, Lech-Maranda E, Robak P. Rituximab plus fludarabine and cyclophosphamide or other agents in chronic lymphocytic leukemia. *Expert Rev Anticancer Ther* 2010;10:1529-43.
333. Gonzalez D, Martinez P, Wade R, et al. Mutational status of the TP53 gene as a predictor of response and survival in patients with chronic lymphocytic leukemia: results from the LRF CLL4 trial. *J Clin Oncol* 2011;29:2223-9.

334. Dreger P, Corradini P, Kimby E, et al. Indications for allogeneic stem cell transplantation in chronic lymphocytic leukemia: the EBMT transplant consensus. *Leukemia* 2007;21:12-7.
335. Bantia S, Miller PJ, Parker CD, et al. Purine nucleoside phosphorylase inhibitor BCX-1777 (Immucillin-H)--a novel potent and orally active immunosuppressive agent. *Int Immunopharmacol* 2001;1:1199-210.
336. Balakrishnan K, Nimmanapalli R, Ravandi F, Keating MJ, Gandhi V. Forodesine, an inhibitor of purine nucleoside phosphorylase, induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood* 2006;108:2392-8.
337. Bantia S, Ananth SL, Parker CD, Horn LL, Upshaw R. Mechanism of inhibition of T-acute lymphoblastic leukemia cells by PNP inhibitor--BCX-1777. *Int Immunopharmacol* 2003;3:879-87.
338. Kicska GA, Long L, Horig H, et al. Immucillin H, a powerful transition-state analog inhibitor of purine nucleoside phosphorylase, selectively inhibits human T lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001;98:4593-8.
339. Jacobsson B, Albertioni F, Eriksson S. Deoxynucleoside anabolic enzyme levels in acute myelocytic leukemia and chronic lymphocytic leukemia cells. *Cancer Lett* 2001;165:195-200.
340. Alonso R, Lopez-Guerra M, Upshaw R, et al. Forodesine has high antitumor activity in chronic lymphocytic leukemia and activates p53-independent mitochondrial apoptosis by induction of p73 and BIM. *Blood* 2009;114:1563-75.
341. Balakrishnan K, Verma D, O'Brien S, et al. Phase 2 and pharmacodynamic study of oral forodesine in patients with advanced, fludarabine-treated chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2010;116:886-92.
342. Balakrishnan K, Burger JA, Quiroga MP, et al. Influence of bone marrow stromal microenvironment on forodesine-induced responses in CLL primary cells. *Blood* 2010;116:1083-91.
343. Shen ZX, Chen GQ, Ni JH, et al. Use of arsenic trioxide (As₂O₃) in the treatment of acute promyelocytic leukemia (APL): II. Clinical efficacy and pharmacokinetics in relapsed patients. *Blood* 1997;89:3354-60.
344. Powell BL, Moser B, Stock W, et al. Arsenic trioxide improves event-free and overall survival for adults with acute promyelocytic leukemia: North American Leukemia Intergroup Study C9710. *Blood* 2010;116:3751-7.
345. Antman KH. Introduction: the history of arsenic trioxide in cancer therapy. *Oncologist* 2001;6 Suppl 2:1-2.
346. Vey N, Bosly A, Guerci A, et al. Arsenic trioxide in patients with myelodysplastic syndromes: a phase II multicenter study. *J Clin Oncol* 2006;24:2465-71.

347. Wang ZY, Chen Z. Acute promyelocytic leukemia: from highly fatal to highly curable. *Blood* 2008;111:2505-15.
348. Rollig C, Illmer T. The efficacy of arsenic trioxide for the treatment of relapsed and refractory multiple myeloma: a systematic review. *Cancer Treat Rev* 2009;35:425-30.
349. Zhang W, Ohnishi K, Shigeno K, et al. The induction of apoptosis and cell cycle arrest by arsenic trioxide in lymphoid neoplasms. *Leukemia* 1998;12:1383-91.
350. Li HM, Long Y, Qing C, et al. Arsenic trioxide induces apoptosis of Burkitt lymphoma cell lines through multiple apoptotic pathways and triggers antiangiogenesis. *Oncol Res* 2011;19:149-63.
351. Jutooru I, Chadalapaka G, Sreevalsan S, et al. Arsenic trioxide downregulates specificity protein (Sp) transcription factors and inhibits bladder cancer cell and tumor growth. *Exp Cell Res* 2010;316:2174-88.
352. Stevens JJ, Graham-Evans B, Walker AM, Armstead B, Tchounwou PB. Cytotoxic Effect of Arsenic Trioxide in Adenocarcinoma Colorectal Cancer (HT-29) Cells. *Met Ions Biol Med* 2008;10:458-62.
353. Pettersson HM, Pietras A, Munksgaard PM, et al. Arsenic trioxide is highly cytotoxic to small cell lung carcinoma cells. *Mol Cancer Ther* 2009;8:160-70.
354. Bairey O, Vanichkin A, Shpilberg O. Arsenic-trioxide-induced apoptosis of chronic lymphocytic leukemia cells. *Int J Lab Hematol* 2010;32:e77-e85.
355. Zhou Y, Hileman EO, Plunkett W, Keating MJ, Huang P. Free radical stress in chronic lymphocytic leukemia cells and its role in cellular sensitivity to ROS-generating anticancer agents. *Blood* 2003;101:4098-104.
356. Biswas S, Zhao X, Mone AP, et al. Arsenic trioxide and ascorbic acid demonstrate promising activity against primary human CLL cells in vitro. *Leuk Res* 2010;34:925-31.
357. Roecklein BA, Torok-Storb B. Functionally distinct human marrow stromal cell lines immortalized by transduction with the human papilloma virus E6/E7 genes. *Blood* 1995;85:997-1005.
358. Prior SJ, Hagberg JM, Paton CM, et al. DNA sequence variation in the promoter region of the VEGF gene impacts VEGF gene expression and maximal oxygen consumption. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 2006;290:H1848-H1855.
359. Renner W, Kotschan S, Hoffmann C, Obermayer-Pietsch B, Pilger E. A common 936 C/T mutation in the gene for vascular endothelial growth factor is associated with vascular endothelial growth factor plasma levels. *J Vasc Res* 2000;37:443-8.

360. Watson CJ, Webb NJ, Bottomley MJ, Brenchley PE. Identification of polymorphisms within the vascular endothelial growth factor (VEGF) gene: correlation with variation in VEGF protein production. *Cytokine* 2000;12:1232-5.
361. Awata T, Inoue K, Kurihara S, et al. A common polymorphism in the 5'-untranslated region of the VEGF gene is associated with diabetic retinopathy in type 2 diabetes. *Diabetes* 2002;51:1635-9.
362. Brogan IJ, Khan N, Isaac K, Hutchinson JA, Pravica V, Hutchinson IV. Novel polymorphisms in the promoter and 5' UTR regions of the human vascular endothelial growth factor gene. *Hum Immunol* 1999;60:1245-9.
363. Hansen TF, Spindler KL, Lorentzen KA, et al. The importance of -460 C/T and +405 G/C single nucleotide polymorphisms to the function of vascular endothelial growth factor A in colorectal cancer. *J Cancer Res Clin Oncol* 2010;136:751-8.
364. Jain L, Vargo CA, Danesi R, et al. The role of vascular endothelial growth factor SNPs as predictive and prognostic markers for major solid tumors. *Mol Cancer Ther* 2009;8:2496-508.
365. Stevens A, Soden J, Brenchley PE, Ralph S, Ray DW. Haplotype analysis of the polymorphic human vascular endothelial growth factor gene promoter. *Cancer Res* 2003;63:812-6.
366. Thorstenson YR, Roxas A, Kroiss R, et al. Contributions of ATM mutations to familial breast and ovarian cancer. *Cancer Res* 2003;63:3325-33.
367. Maillet P, Bonnefoi H, Vaudan-Vutskits G, et al. Constitutional alterations of the ATM gene in early onset sporadic breast cancer. *J Med Genet* 2002;39:751-3.
368. Atencio DP, Iannuzzi CM, Green S, Stock RG, Bernstein JL, Rosenstein BS. Screening breast cancer patients for ATM mutations and polymorphisms by using denaturing high-performance liquid chromatography. *Environ Mol Mutagen* 2001;38:200-8.
369. Vorechovsky I, Luo L, Dyer MJ, et al. Clustering of missense mutations in the ataxia-telangiectasia gene in a sporadic T-cell leukaemia. *Nat Genet* 1997;17:96-9.
370. Greiner TC, Dasgupta C, Ho VV, et al. Mutation and genomic deletion status of ataxia telangiectasia mutated (ATM) and p53 confer specific gene expression profiles in mantle cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:2352-7.
371. Navrkalova V, Sebejova L, Zemanova J, et al. ATM mutations uniformly lead to ATM dysfunction in chronic lymphocytic leukemia: application of functional test using doxorubicin. *Haematologica* 2013;98:1124-31.
372. Greiner TC, Dasgupta C, Ho VV, et al. Mutation and genomic deletion status of ataxia telangiectasia mutated (ATM) and p53 confer specific gene expression profiles in mantle cell lymphoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103:2352-7.

373. Rahal R, Frick M, Romero R, et al. Pharmacological and genomic profiling identifies NF-kappaB-targeted treatment strategies for mantle cell lymphoma. *Nat Med* 2014;20:87-92.
374. Crowther-Swanepoel D, Broderick P, Di Bernardo MC, et al. Common variants at 2q37.3, 8q24.21, 15q21.3 and 16q24.1 influence chronic lymphocytic leukemia risk. *Nat Genet* 2010;42:132-6.
375. Wrobel T, Mazur G, Dzietczenia J, Gebura K, Kuliczowski K, Bogunia-Kubik K. VEGF and bFGF gene polymorphisms in Polish patients with B-CLL. *Med Oncol* 2013;30:456.
376. Pepper C, Ward R, Lin TT, et al. Highly purified CD38+ and. *Leukemia* 2007;21:687-96.
377. Watson CJ, Webb NJ, Bottomley MJ, Brenchley PE. Identification of polymorphisms within the vascular endothelial growth factor (VEGF) gene: correlation with variation in VEGF protein production. *Cytokine* 2000;12:1232-5.
378. Stevens A, Soden J, Brenchley PE, Ralph S, Ray DW. Haplotype analysis of the polymorphic human vascular endothelial growth factor gene promoter. *Cancer Res* 2003;63:812-6.
379. Brogan IJ, Khan N, Isaac K, Hutchinson JA, Pravica V, Hutchinson IV. Novel polymorphisms in the promoter and 5' UTR regions of the human vascular endothelial growth factor gene. *Hum Immunol* 1999;60:1245-9.
380. Aguayo A, Kantarjian H, Manshour T, et al. Angiogenesis in acute and chronic leukemias and myelodysplastic syndromes. *Blood* 2000;96:2240-5.
381. Hussong JW, Rodgers GM, Shami PJ. Evidence of increased angiogenesis in patients with acute myeloid leukemia. *Blood* 2000;95:309-13.
382. Kim DH, Lee NY, Lee MH, Sohn SK, Do YR, Park JY. Vascular endothelial growth factor (VEGF) gene (VEGFA) polymorphism can predict the prognosis in acute myeloid leukaemia patients. *Br J Haematol* 2008;140:71-9.
383. Kim DH, Xu W, Kamel-Reid S, et al. Clinical relevance of vascular endothelial growth factor (VEGFA) and VEGF receptor (VEGFR2) gene polymorphism on the treatment outcome following imatinib therapy. *Ann Oncol* 2010;21:1179-88.
384. Lakkireddy S, Aula S, Kapley A, et al. Association of Vascular Endothelial Growth Factor A (VEGFA) and its Receptor (VEGFR2) Gene Polymorphisms with Risk of Chronic Myeloid Leukemia and Influence on Clinical Outcome. *Mol Diagn Ther* 2016;20:33-44.
385. Diao LP, Yu XM, Gao YH, et al. Association of VEGF genetic polymorphisms with the clinical characteristics of non-Hodgkin's lymphoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2009;135:1473-81.

386. Wrobel T, Mazur G, Dzietczenia J, Gebura K, Kulickowski K, Bogunia-Kubik K. VEGF and bFGF gene polymorphisms in patients with non-Hodgkin's lymphoma. *Biomed Res Int* 2013;2013:159813.
387. Shanafelt T, Zent C, Byrd J, et al. Phase II trials of single-agent anti-VEGF therapy for patients with chronic lymphocytic leukemia. *Leuk Lymphoma* 2010;51:2222-9.
388. Kunstlinger H, Binot E, Merkelbach-Bruse S, et al. High-resolution melting analysis is a sensitive diagnostic tool to detect imatinib-resistant and imatinib-sensitive PDGFRA exon 18 mutations in gastrointestinal stromal tumors. *Hum Pathol* 2014;45:573-82.
389. Monzon FA, Ogino S, Hammond ME, Halling KC, Bloom KJ, Nikiforova MN. The role of KRAS mutation testing in the management of patients with metastatic colorectal cancer. *Arch Pathol Lab Med* 2009;133:1600-6.
390. Carter SL, Cibulskis K, Helman E, et al. Absolute quantification of somatic DNA alterations in human cancer. *Nat Biotechnol* 2012;30:413-21.
391. Ding L, Ley TJ, Larson DE, et al. Clonal evolution in relapsed acute myeloid leukaemia revealed by whole-genome sequencing. *Nature* 2012;481:506-10.
392. Nadeu F, Delgado J, Royo C, et al. Clinical impact of clonal and subclonal TP53, SF3B1, BIRC3, NOTCH1, and ATM mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2016;127:2122-30.
393. Landau DA, Carter SL, Stojanov P, et al. Evolution and impact of subclonal mutations in chronic lymphocytic leukemia. *Cell* 2013;152:714-26.
394. Skowronska A, Austen B, Powell JE, et al. ATM germline heterozygosity does not play a role in chronic lymphocytic leukemia initiation but influences rapid disease progression through loss of the remaining ATM allele. *Haematologica* 2012;97:142-6.
395. Hernandez JA, Hernandez-Sanchez M, Rodriguez-Vicente AE, et al. A Low Frequency of Losses in 11q Chromosome Is Associated with Better Outcome and Lower Rate of Genomic Mutations in Patients with Chronic Lymphocytic Leukemia. *PLoS One* 2015;10:e0143073.
396. Hurtado AM, Chen-Liang TH, Przychodzen B, et al. Prognostic signature and clonality pattern of recurrently mutated genes in inactive chronic lymphocytic leukemia. *Blood Cancer J* 2015;5:e342.
397. Baliakas P, Hadzidimitriou A, Sutton LA, et al. Recurrent mutations refine prognosis in chronic lymphocytic leukemia. *Leukemia* 2015;29:329-36.
398. Schuh A, Becq J, Humphray S, et al. Monitoring chronic lymphocytic leukemia progression by whole genome sequencing reveals heterogeneous clonal evolution patterns. *Blood* 2012;120:4191-6.

399. Hallek M. Signaling the end of chronic lymphocytic leukemia: new frontline treatment strategies. *Blood* 2013;122:3723-34.
400. Awan FT, Byrd JC. New strategies in chronic lymphocytic leukemia: shifting treatment paradigms. *Clin Cancer Res* 2014;20:5869-74.
401. Fabbri G, Dalla-Favera R. The molecular pathogenesis of chronic lymphocytic leukaemia. *Nat Rev Cancer* 2016;16:145-62.
402. Merkel O, Heyder C, Asslaber D, et al. Arsenic trioxide induces apoptosis preferentially in B-CLL cells of patients with unfavourable prognostic factors including del17p13. *J Mol Med (Berl)* 2008;86:541-52.
403. Redondo-Munoz J, Escobar-Diaz E, Hernandez Del CM, et al. Induction of B-chronic lymphocytic leukemia cell apoptosis by arsenic trioxide involves suppression of the phosphoinositide 3-kinase/Akt survival pathway via c-jun-NH2 terminal kinase activation and PTEN upregulation. *Clin Cancer Res* 2010;16:4382-91.
404. Amigo-Jimenez I, Bailon E, Ugarte-Berzal E, Aguilera-Montilla N, Garcia-Marco JA, Garcia-Pardo A. Matrix metalloproteinase-9 is involved in chronic lymphocytic leukemia cell response to fludarabine and arsenic trioxide. *PLoS One* 2014;9:e99993.
405. Chiaretti S, Marinelli M, Del G, I, et al. NOTCH1, SF3B1, BIRC3 and TP53 mutations in patients with chronic lymphocytic leukemia undergoing first-line treatment: correlation with biological parameters and response to treatment. *Leuk Lymphoma* 2014;55:2785-92.
406. Maley CC, Galipeau PC, Finley JC, et al. Genetic clonal diversity predicts progression to esophageal adenocarcinoma. *Nat Genet* 2006;38:468-73.
407. Greaves M, Maley CC. Clonal evolution in cancer. *Nature* 2012;481:306-13.
408. Ishitsuka K, Suzumiya J, Aoki M, Ogata K, Hara S, Tamura K. Therapeutic potential of arsenic trioxide with or without interferon-alpha for relapsed/refractory adult T-cell leukemia/lymphoma. *Haematologica* 2007;92:719-20.
409. Park MT, Kang YH, Park IC, et al. Combination treatment with arsenic trioxide and phytosphingosine enhances apoptotic cell death in arsenic trioxide-resistant cancer cells. *Mol Cancer Ther* 2007;6:82-92.
410. Yan H, Wang YC, Li D, et al. Arsenic trioxide and proteasome inhibitor bortezomib synergistically induce apoptosis in leukemic cells: the role of protein kinase Cdelta. *Leukemia* 2007;21:1488-95.
411. Takahashi S. Combination therapy with arsenic trioxide for hematological malignancies. *Anticancer Agents Med Chem* 2010;10:504-10.

412. Efficace F, Mandelli F, Avvisati G, et al. Randomized phase III trial of retinoic acid and arsenic trioxide versus retinoic acid and chemotherapy in patients with acute promyelocytic leukemia: health-related quality-of-life outcomes. *J Clin Oncol* 2014;32:3406-12.
413. Arteaga MF, Mikesch JH, Fung TK, So CW. Epigenetics in acute promyelocytic leukaemia pathogenesis and treatment response: a TRAnsition to targeted therapies. *Br J Cancer* 2015;112:413-8.
414. Ramos AM, Fernandez C, Amran D, Sancho P, de BE, Aller P. Pharmacologic inhibitors of PI3K/Akt potentiate the apoptotic action of the antileukemic drug arsenic trioxide via glutathione depletion and increased peroxide accumulation in myeloid leukemia cells. *Blood* 2005;105:4013-20.
415. Tabellini G, Cappellini A, Tazzari PL, et al. Phosphoinositide 3-kinase/Akt involvement in arsenic trioxide resistance of human leukemia cells. *J Cell Physiol* 2005;202:623-34.
416. Bornhauser BC, Bonapace L, Lindholm D, et al. Low-dose arsenic trioxide sensitizes glucocorticoid-resistant acute lymphoblastic leukemia cells to dexamethasone via an Akt-dependent pathway. *Blood* 2007;110:2084-91.
417. Estan MC, Calvino E, de BE, et al. 2-Deoxy-D-glucose cooperates with arsenic trioxide to induce apoptosis in leukemia cells: involvement of IGF-1R-regulated Akt/mTOR, MEK/ERK and LKB-1/AMPK signaling pathways. *Biochem Pharmacol* 2012;84:1604-16.
418. Cuni S, Perez-Aciego P, Perez-Chacon G, et al. A sustained activation of PI3K/NF-kappaB pathway is critical for the survival of chronic lymphocytic leukemia B cells. *Leukemia* 2004;18:1391-400.
419. Hallaert DY, Jaspers A, van Noesel CJ, van Oers MH, Kater AP, Eldering E. c-Abl kinase inhibitors overcome CD40-mediated drug resistance in CLL: implications for therapeutic targeting of chemoresistant niches. *Blood* 2008;112:5141-9.
420. Bernal A, Pastore RD, Asgary Z, et al. Survival of leukemic B cells promoted by engagement of the antigen receptor. *Blood* 2001;98:3050-7.
421. Hu X, Haney N, Kropp D, Kabore AF, Johnston JB, Gibson SB. Lysophosphatidic acid (LPA) protects primary chronic lymphocytic leukemia cells from apoptosis through LPA receptor activation of the anti-apoptotic protein AKT/PKB. *J Biol Chem* 2005;280:9498-508.
422. Balakrishnan K, Burger JA, Fu M, Doifode T, Wierda WG, Gandhi V. Regulation of Mcl-1 expression in context to bone marrow stromal microenvironment in chronic lymphocytic leukemia. *Neoplasia* 2014;16:1036-46.
423. Buggins AG, Pepper CJ. The role of Bcl-2 family proteins in chronic lymphocytic leukaemia. *Leuk Res* 2010;34:837-42.

424. Buchner M, Baer C, Prinz G, et al. Spleen tyrosine kinase inhibition prevents chemokine- and integrin-mediated stromal protective effects in chronic lymphocytic leukemia. *Blood* 2010;115:4497-506.
425. Lunghi P, Giuliani N, Mazzer L, et al. Targeting MEK/MAPK signal transduction module potentiates ATO-induced apoptosis in multiple myeloma cells through multiple signaling pathways. *Blood* 2008;112:2450-62.
426. Wang R, Xia L, Gabrilove J, Waxman S, Jing Y. Downregulation of Mcl-1 through GSK-3 β activation contributes to arsenic trioxide-induced apoptosis in acute myeloid leukemia cells. *Leukemia* 2013;27:315-24.
427. Baysan A, Yel L, Gollapudi S, Su H, Gupta S. Arsenic trioxide induces apoptosis via the mitochondrial pathway by upregulating the expression of Bax and Bim in human B cells. *Int J Oncol* 2007;30:313-8.
428. Amigo-Jimenez I, Bailon E, Aguilera-Montilla N, Terol MJ, Garcia-Marco JA, Garcia-Pardo A. Bone marrow stroma-induced resistance of chronic lymphocytic leukemia cells to arsenic trioxide involves Mcl-1 upregulation and is overcome by inhibiting the PI3K δ or PKC β signaling pathways. *Oncotarget* 2015;6:44832-48.
429. Crassini K, Stevenson WS, Mulligan SP, Best OG. The MEK1/2 inhibitor, MEKi-1, induces cell death in chronic lymphocytic leukemia cells under conditions that mimic the tumor microenvironment and is synergistic with fludarabine. *Leuk Lymphoma* 2015;56:3407-17.

Abreviaturas

1. The first of these is the fact that the system is not a simple one, but a complex one, involving many different factors, and the results of which are not always predictable.
2. The second is the fact that the system is not a static one, but a dynamic one, in which the results of the system are constantly changing, and the system itself is constantly evolving.
3. The third is the fact that the system is not a closed one, but an open one, in which the results of the system are constantly changing, and the system itself is constantly evolving.
4. The fourth is the fact that the system is not a simple one, but a complex one, involving many different factors, and the results of which are not always predictable.
5. The fifth is the fact that the system is not a static one, but a dynamic one, in which the results of the system are constantly changing, and the system itself is constantly evolving.
6. The sixth is the fact that the system is not a closed one, but an open one, in which the results of the system are constantly changing, and the system itself is constantly evolving.
7. The seventh is the fact that the system is not a simple one, but a complex one, involving many different factors, and the results of which are not always predictable.
8. The eighth is the fact that the system is not a static one, but a dynamic one, in which the results of the system are constantly changing, and the system itself is constantly evolving.
9. The ninth is the fact that the system is not a closed one, but an open one, in which the results of the system are constantly changing, and the system itself is constantly evolving.
10. The tenth is the fact that the system is not a simple one, but a complex one, involving many different factors, and the results of which are not always predictable.

References

8. ABREVIATURAS

Ac, Acs: Anticuerpo, anticuerpos

Ag, Ags: Antígeno, antígenos

AT: Ataxia-telangiectasia

Apaf-1: Apoptosis protease-activating factor-1, factor 1 activador de proteasas de apoptosis

APRIL: A proliferation-inducing ligand, ligando que induce proliferación

ATM: Ataxia telangiectasia mutated, mutado en ataxia telangiectasia

ATO: Arsenic trioxide, trióxido de arsénico

ATP: Adenosine triphosphate, adenosina trifosfato

Bad: Bcl-2-antagonist of cell death, antagonista de Bcl-2 en la muerte celular

Bak: Bcl-2-antagonist/killer-1, antagonista de Bcl-2/asesino-1

Bax: Bcl-2-associated X protein, proteína X asociada a Bcl-2

Bcl-2: B cell lymphoma protein 2, proteína 2 de linfoma de células B

Bcl-B: Apoptosis regulator Bcl-B/Bcl-2-like protein 10, regulador de la apoptosis Bcl-B/proteína 10 similar a Bcl-2

Bcl-w: Bcl-2-like 2 protein, proteína 2 similar a Bcl-2

Bcl-xL: Bcl-2-related protein long form of Bcl-x, proteína relacionada con Bcl-2 forma larga de Bcl-x

BCR: B-cell receptor, receptor de célula B

Bfl-1: Bcl-2 related gene in fetal liver/Bcl-2-related protein A1, gen relacionado con Bcl-2 en hígado fetal

BH: Bcl-2 homology domain, dominio de homología a Bcl-2

Bid: BH3-interacting domain death agonist, dominio agonista de muerte que interacciona con BH3

Bim: Bcl-2-interacting mediator of cell death, mediador de muerte celular que interacciona con Bcl-2

BIRC3, Baculoviral IAP (Inhibitor of apoptosis protein) repeat-containing protein 3, proteína 3 conteniendo la repetición de IAP (proteína inhibidora de la apoptosis) baculoviral

- BMSCs: Bone marrow stromal cells, células estromales de médula ósea
- Bok: Bcl-2 related ovarian killer, asesino de ovario relacionado con la familia Bcl-2
- BSA: Bovine serum albumin, albúmina de suero bovino
- CD38: Cluster of differentiation 38, cluster de diferenciación 38
- CoA: Coenzima A
- GC: Germinal center, centro germinal
- dCK: desoxicitidina quinasa
- dGMP, dGTP: deoxyguanosine triphosphate, desoxiguanosina trifosfato, deoxyguanosine monophosphate, desoxiguanosina monofosfato
- dGuO: 2'-desoxiguanosina
- DMSO: Dimethyl sulfoxide, dimetilsulfóxido
- DNA: Desoxyribonucleic acid, ácido desoxirribonucleico
- ERK: Extracellular signal-regulated kinase, quinasa regulada por señales extracelulares
- FBS: Fetal bovine serum, suero bovino fetal
- FDCs: Follicular dendritic cells, células Dendríticas Foliculares
- FITC: Fluorescein isothiocyanate, isotiocianato de fluoresceína
- HBOC: Hereditary breast and ovarian cancer, cancer hereditario de mama y ovario
- HRM: High resolution melting
- HSCs: Hematopoietic stem cells, células madre hematopoyéticas
- HSM: Somatic hypermutation, hipermutación somática
- HWE: Hardy-Weinberg equilibrium, equilibrio Hardy-Weinberg
- ICAM-1: Intercellular adhesion molecule 1, molécula 1 de adhesión intercelular
- ICN1: Intracellular portion of NOTCH1, porción intracelular de NOTCH1
- IFN γ : Interferon gamma, interferón gamma
- Ig, Igs: Inmunoglobulina, inmunoglobulinas
- IgVH, M, UM: Immunoglobulin heavy-chain variable region, región variable de las cadenas pesadas de las Inmunoglobulinas, Mutated, mutado, unmutated, no mutado
- IL: Interleukin, interleuquina
- JNK: Jun N-terminal kinase, quinasa de Jun en N-terminal
- LD: Linkage disequilibrium, desequilibrio de ligamiento
- LLC: Leucemia linfocítica crónica

- Lyn: Lck/Yes-related novel protein tyrosine kinase/Tyrosine-protein kinase Lyn, nueva proteína tirosinaquinasa relacionada con Lck/Yes/tirosina quinasa Lyn
- MAF: Minor allele frequency, frecuencia del alelo menor
- MAPKs: Mitogen-activated protein kinases, quinasas activadas por mitógenos
- MHC: Major histocompatibility complex, complejo mayor de histocompatibilidad
- Mcl-1: Myeloid cell leukemia sequence 1, secuencia 1 de leucemia de células mieloides
- MCL: Mantle Cell Lymphoma, linfoma de células del manto
- MDR: Minimal residual disease, enfermedad mínima residual
- MEK: Dual specificity mitogen-activated protein kinase kinase 1, quinasa 1 de especificidad dual de MAPK
- MMP: Matrix metalloproteinase, metaloproteínasa de matriz
- MMP-9: Matrix Metalloproteinase-9, metaloproteínasa de matriz-9
- MSCs: Mesenchymal stromal cells, células estromales de origen mesenquimal
- NF- κ B: Nuclear factor κ B, factor nuclear κ B
- NGS: Next-generation sequencing, Secuenciación de nueva generación
- NLCs: Nurse-like cells, células nodriza (de estirpe mieloide)
- NOTCH1: Neurogenic locus notch homolog protein 1, proteína 1 homóloga del locus neurogénico notch (de *Drosophila melanogaster*)
- Noxa: Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1, proteína 1 inducida por forbol-12-miristato-13-acetado (PMA)
- OS: Overall survival, supervivencia global
- PBS: Phosphate-buffered saline, tampón fosfato salino
- PCR: Polymerase chain reaction, reacción en cadena de la polimerasa
- SLP: Progression-free survival, supervivencia libre de progresión
- PI: Propidium iodide, yoduro de propidio
- PI3K: Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate 3-kinase, quinasa de fosfatidilinositol-4,5-bifosfato
- PTEN: Phosphatase and tensin homolog, fosfatasa y homólogo de tensina
- Puma: TP53 upregulated modulator of apoptosis/Bcl-2 binding component 3, modulador de la apoptosis inducido por TP53/componente 3 de unión a Bcl-2

R27: Resoligh 27

ROS: Reactive oxygen species, especies reactivas de oxígeno

SF3B1: Splicing factor 3b, subunit 1; subunidad 1 del factor de splicing 3b

SNP: Single Nucleotide Polymorphism, polimorfismo de nucleótido único

STAT3: Signal transducer and activator of transcription 3, transductor de señales y activador de la transcripción 3

TBS: Tris-buffered saline, tampón tris salino

TBS-T: TBS-0.1% Tween®20

TCR: T-cell receptor, receptor de células T

TNF: Tumor necrosis factor, factor de necrosis tumoral

TNFR: Tumor necrosis factor receptor, receptor del factor de necrosis tumoral

TNF- α , Tumor necrosis factor alpha, factor de necrosis tumoral alfa

TP53: Cellular tumor antigen p53, antígeno tumoral celular p53

T-PLL: T-cell prolymphocytic leukemia, leucemia prolinfocítica de células T

TTFT: Time to first treatment, tiempo al primer tratamiento

VCAM-1: Vascular cell adhesion molecule 1, molécula 1 de adhesión de células vasculares

VEGF: Vascular endothelial growth factor, factor de crecimiento del endotelio vascular

VEGFR2: Vascular endothelial growth factor receptor 2, receptor 2 del factor de crecimiento del endotelio Vascular

XIAP: X-chromosome-linked IAP, proteína inhibidora de la apoptosis (IAP) ligada al cromosoma X

ZAP-70: 70 kDa ξ -associated protein, proteína asociada ξ de 70 kDa



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Doctoral dissertation (R.D.99/2011)

Application form for permission to the Publishers

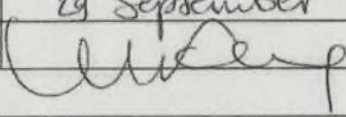
PUBLISHER (BBRC)

Valerie Teng-Brong

I request permission to include an article published by your entity as part of my Doctoral dissertation, which will be deposited in open access mode in my university institutional repository.

AUTHOR TO COMPLETE	
FIRST NAME, LAST NAME	Carol Patricia Lozano Santos
ADDRESS	Alicante street Arroyomolinos Madrid
PHONE & E-MAIL ADDRESS	Carol.lozano2006@yahoo.es
PHD TITLE	"Análisis de alteraciones moleculares como factores pronósticos y estudio del efecto citotóxico <i>in vitro</i> de combinaciones de fármacos en pacientes con Leucemia Linfocítica Crónica"
FACULTY	Medicine
DEPARTMENT / BODY RESPONSIBLE / PROGRAMME ACADEMIC COMMISSION	Biochemistry, Molecular Biology and Biomedicine/ Universidad Complutense de Madrid
PHD SUPERVISOR	JA García Marco
ARTICLE TITLE	<i>Arsenic trioxide synergistically potentiates the cytotoxic effect of fludarabine in chronic lymphocytic leukemia cells by further inactivating the Akt and ERK signaling pathways.</i>
Publication	Biochem Biophys Res Commun. 2015 May 29; 461(2):243-8.
Madrid, 12 th of September of 2016 (Date)	

PUBLISHER REPLY

FILL BY PUBLISHER	
PUBLISHER (Name)	Valerie Teng-Brong-Elsevier.
PERMISSION	<input checked="" type="radio"/> YES <input type="radio"/> NO
PLACE AND DATE	29 September 2016
SIGNATURE STAMP OF THE PUBLISHER	 on behalf of Elsevier.

PROTECCIÓN DE DATOS: Los datos personales recogidos serán incorporados y tratados en el fichero "Doctorado", cuya finalidad es el soporte en los procesos de matrícula y gestión de los doctorandos. Se prevén cesiones a otros órganos de la Administración del estado. El órgano responsable del fichero es Vicerrectorado de Posgrado y Formación Continua. La dirección donde el interesado podrá ejercer los derechos de acceso, rectificación cancelación y oposición ante el mismo es en la Avda. de Séneca, 2, 28040 Madrid, de todo lo cual se informa en cumplimiento del artículo 5 de la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Doctoral dissertation (R.D.99/2011)

Application form for permission to the Publishers

PUBLISHER: *PLOS ONE*

I request permission to include an article published by your entity as part of my Doctoral dissertation, which will be deposited in open access mode in my university institutional repository.

AUTHOR TO COMPLETE	
FIRST NAME, LAST NAME	Carol Patricia Lozano Santos
ADDRESS	Alicante street Arroyomolinos Madrid
PHONE & E-MAIL ADDRESS	Carol.lozano2006@yahoo.es
PhD TITLE	"Análisis de alteraciones moleculares como factores pronósticos y estudio del efecto citotóxico <i>in vitro</i> de combinaciones de fármacos en pacientes con Leucemia Linfocítica Crónica"
FACULTY	Medicine
DEPARTMENT / BODY RESPONSIBLE / PROGRAMME ACADEMIC COMMISSION	Biochemistry, Molecular Biology and Biomedicine/ Universidad Complutense de Madrid
PhD SUPERVISOR	JA García Marco
ARTICLE TITLE	<i>Vascular endothelial growth factor A (VEGFA) gene polymorphisms have an impact on survival in a subgroup of indolent patients with chronic lymphocytic leukaemia.</i>
Publication	<i>PloS One</i> . 2014 June 27;9(6)
Madrid, 20 th of September of 2016 (Date)	

PUBLISHER REPLY

FILL BY PUBLISHER		
PUBLISHER (Name)	PLOS ONE	
PERMISSION	YES	NO
PLACE AND DATE	San Francisco 26 SEPTEMBER 2016	
SIGNATURE STAMP OF THE PUBLISHER	<i>Michael Caligaris</i>	

PROTECCIÓN DE DATOS: Los datos personales recogidos serán incorporados y tratados en el fichero "Doctorado", cuya finalidad es el soporte en los procesos de matrícula y gestión de los doctorandos. Se prevén cesiones a otros órganos de la Administración del estado. El órgano responsable del fichero es Vicerrectorado de Posgrado y Formación Continua. La dirección donde el interesado

Appendix I: List of Witnesses

Page 1 of 1

Name	Address	Occupation	Date of Interview
Mr. J. H. Smith	123 Main St., Toronto	Businessman	June 15, 1964
Mrs. A. B. Jones	456 Elm St., Montreal	Homemaker	June 16, 1964
Mr. C. D. Brown	789 Oak St., Vancouver	Engineer	June 17, 1964
Mr. E. F. Green	101 Pine St., Ottawa	Teacher	June 18, 1964
Mr. G. H. White	202 Cedar St., Winnipeg	Lawyer	June 19, 1964
Mr. I. J. Black	303 Birch St., Calgary	Doctor	June 20, 1964
Mr. K. L. Grey	404 Spruce St., Edmonton	Nurse	June 21, 1964
Mr. M. N. Hall	505 Willow St., Regina	Farmer	June 22, 1964
Mr. O. P. Young	606 Ash St., Saskatoon	Student	June 23, 1964
Mr. Q. R. King	707 Hickory St., Brandon	Clerk	June 24, 1964
Mr. S. T. Lee	808 Magnolia St., Winnipeg	Artist	June 25, 1964
Mr. U. V. Scott	909 Jasmine St., Vancouver	Writer	June 26, 1964
Mr. W. X. Baker	1010 Rose St., Toronto	Musician	June 27, 1964
Mr. Y. Z. Adams	1111 Lily St., Montreal	Scientist	June 28, 1964
Mr. A. B. Carter	1212 Tulip St., Ottawa	Historian	June 29, 1964
Mr. C. D. Evans	1313 Daisy St., Vancouver	Politician	June 30, 1964
Mr. E. F. Green	1414 Violet St., Winnipeg	Economist	July 1, 1964
Mr. G. H. White	1515 Iris St., Calgary	Architect	July 2, 1964
Mr. I. J. Black	1616 Poppy St., Edmonton	Journalist	July 3, 1964
Mr. K. L. Grey	1717 Carnation St., Regina	Physician	July 4, 1964
Mr. M. N. Hall	1818 Pansy St., Saskatoon	Engineer	July 5, 1964
Mr. O. P. Young	1919 Zinnia St., Brandon	Teacher	July 6, 1964
Mr. Q. R. King	2020 Petunia St., Winnipeg	Lawyer	July 7, 1964
Mr. S. T. Lee	2121 Geranium St., Vancouver	Artist	July 8, 1964
Mr. U. V. Scott	2222 Marigold St., Toronto	Writer	July 9, 1964
Mr. W. X. Baker	2323 Begonia St., Montreal	Musician	July 10, 1964
Mr. Y. Z. Adams	2424 Fuchsia St., Ottawa	Scientist	July 11, 1964
Mr. A. B. Carter	2525 Impatiens St., Vancouver	Historian	July 12, 1964
Mr. C. D. Evans	2626 Verbena St., Winnipeg	Politician	July 13, 1964
Mr. E. F. Green	2727 Zinnia St., Calgary	Economist	July 14, 1964
Mr. G. H. White	2828 Pansy St., Edmonton	Architect	July 15, 1964
Mr. I. J. Black	2929 Marigold St., Regina	Journalist	July 16, 1964
Mr. K. L. Grey	3030 Impatiens St., Saskatoon	Physician	July 17, 1964
Mr. M. N. Hall	3131 Geranium St., Brandon	Engineer	July 18, 1964
Mr. O. P. Young	3232 Fuchsia St., Winnipeg	Teacher	July 19, 1964



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

Doctoral dissertation (R.D.99/2011)

Application form for permission to the Publishers

PUBLISHER: LEUKEMIA AND LYMPHOMA, PAPER + EBOOK

I request permission to include an article published by your entity as part of my Doctoral dissertation, which will be deposited in open access mode in my university institutional repository.

AUTHOR TO COMPLETE

FIRST NAME, LAST NAME	Carol Patricia Lozano Santos
ADDRESS	Alicante street Arroyomolinos Madrid
PHONE & E-MAIL ADDRESS	Carol.lozano2006@yahoo.es
PhD TITLE	"Análisis de alteraciones moleculares como factores pronósticos y estudio del efecto citotóxico <i>in vitro</i> de combinaciones de fármacos en pacientes con Leucemia Linfocítica Crónica"
FACULTY	Medicine
DEPARTMENT / BODY RESPONSIBLE / PROGRAMME ACADEMIC COMMISSION	Biochemistry, Molecular Biology and Biomedicine Universidad Complutense de Madrid
PhD SUPERVISOR	JA García Marco
ARTICLE TITLE	<i>Biallelic ATM alterations detected at diagnosis identify a subset of treatment-naïve chronic lymphocytic leukemia patients with reduced overall survival similar to patients with p53 deletion</i>
Publication	Leuk Lymphoma. 2016 Aug 8:1-7.
Madrid, 20 th of September of 2016 (Date)	

PUBLISHER REPLY

FILL BY PUBLISHER		Reviewed by
PUBLISHER (Name)		Prof. John Seymour
PERMISSION	<input checked="" type="radio"/> YES	<input type="radio"/> NO
PLACE AND DATE		21 SEP 2016
SIGNATURE STAMP OF THE PUBLISHER		

PROTECCIÓN DE DATOS: Los datos personales recogidos serán incorporados y tratados en el fichero "Doctorado", cuya finalidad es el soporte en los procesos de matrícula y gestión de los doctorandos. Se prevén cesiones a otros órganos de la Administración del estado. El órgano responsable del fichero es Vicerrectorado de Posgrado y Formación Continua. La dirección donde el interesado podrá ejercer los derechos de acceso, rectificación cancelación y oposición ante el mismo es en la Avda. de Séneca, 2, 28040 Madrid, de todo lo cual se informa en cumplimiento del artículo 5 de la Ley Orgánica 15/1999, de 13 de diciembre, de Protección de Datos de Carácter Personal